

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE  
UN ENZIMA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS  
AMINOGLICÓSIDOS: 6-ADENILTRANSFERASA DE  
“BACILLUS SUBTILIS”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Montserrat Latorre Gutiérrez**

Bajo la dirección de los doctores  
Agatha Basida Codina y Eduardo García-Junceda Redondo

**Madrid, 2008**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UN  
ENZIMA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS  
AMINOGLICÓSIDOS: 6-ADENILTRANSFERASA DE *Bacillus  
subtilis***

Memoria presentada por **Dña. Montserrat Latorre Gutiérrez** para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores de la Tesis: Dra. Ágatha Bastida Codina.

Dr. Eduardo García-Junceda Redondo.

Instituto de Química Orgánica General, CSIC.

Tutor: Dr. Jesús Pérez Gil.

Madrid 2008



El trabajo recogido en esta memoria se ha realizado en el Departamento de Química Orgánica Biológica del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de la Dra. Ágatha Bastida Codina y el Dr. Eduardo García-Junceda Redondo. El trabajo ha estado financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia dentro de los Proyectos “*Obtención de nuevos biocatalizadores y desarrollo de rutas de síntesis quimioenzimáticas en fase líquida de carbohidratos con potencial utilidad terapéutica*” (CTQ2004-03523/BQU) y “*Recuperación terapéutica de antibióticos aminoglicósidos. Caracterización de los enzimas que confieren resistencia a estos antibióticos*” (200680I223). Dña. Montserrat Latorre ha sido financiada por una Beca-Contrato del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Comunidad de Madrid (convocatoria 2003).

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones y participaciones en congresos:

### Publicaciones

Corzana, F., Cuesta, I., Bastida, A., Hidalgo, A., Latorre, M., González, C., García-Junceda, E., Jiménez-Barbero, J., Asensio, J.L. (2005). Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by bacterial defence proteins: NMR study of the structural and conformational features of streptomycin inactivation by *Bacillus subtilis* aminoglycoside-6-adenyltransferase. *Chem. Eur. J.*, **11**: 5102-5113.

Latorre, M., Peñalver, P., Revuelta, J., Asensio, J.L., García-Junceda, E., Bastida, A. (2007). Rescue of the streptomycin antibiotic activity by using streptidine as a “decoy acceptor” for the aminoglycoside-inactivating enzyme adenyltransferase. *Chem. Commun.*, **27**: 2829-2831.

## Congresos

Póster: “Aminoglycoside 6-adenyltransferase as a tool for the development of new antibiotic drugs “.

Julio 2005: Biotrans 2005, VII International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (Delft, Holanda).

Autores: Latorre, M., Pérez-Gil, J., García-Junceda, E., Bastida, A.

Póster: “Use of decoy acceptor to rescue the activity of aminoglycoside antibiotics against aminoglycoside-modifying enzymes”.

Septiembre 2006: VIII Jornadas de Carbohidratos (RSEQ) (Alcalá de Henares, España).

Autores: Latorre, M., García-Junceda, E., Bastida, A.

Póster: “Activity rescue of aminoglycoside antibiotics against aminoglycoside-modifying enzymes”.

Julio 2007: Biotrans 2007, VIII International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (Oviedo, España).

Autores: Latorre, M., Martínez, J.A., García-Junceda, E., Bastida, A.

## Agradecimientos

Esta tesis se ha podido realizar gracias a la colaboración de muchas personas. Quisiera agradecer a todas ellas su participación.

Quiero agradecer a la Dra. Ágatha Bastida y al Dr. Eduardo García-Junceda el haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, así como por su asesoramiento y enseñanzas a lo largo de estos años.

A mi tutor el Dr. Jesús Pérez-Gil, por su ayuda en los estudios de dicroísmo circular y por la dedicación y tiempo invertidos en mi trabajo desde el principio.

Al Dr. Juan Luis Asensio por la realización de los estudios de RMN.

A la Dra. Nuria Campillo por toda su ayuda en los estudios de modelización molecular y en la interpretación de los resultados.

Al grupo de la Dra. Isabel Usón por sus esfuerzos en los intentos de cristalización de la ANT(6).

Al Prof. Peter Westh por haberme admitido en su grupo de investigación durante mis tres meses de estancia en la Universidad de Roskilde, y por sus enseñanzas en el campo de la microcalorimetría.

A Pablo Peñalver por su ayuda con la fluorescencia y a Mario Torrado por enseñarme a dar los primeros pasos con el dicrógrafo, gracias a los dos!.

Muy especialmente quisiera agradecer a Guillermo Corrales toda su ayuda y amabilidad en el laboratorio, siempre dispuesto a resolver cualquier problema que se presente.

A todos mis compañeros del departamento y del instituto que han pasado a lo largo de este tiempo, muchas gracias a todos por vuestra ayuda y por los

buenos momentos vividos. Sé que me llevo conmigo un buen puñado de amigos.

Si hay alguien a quien deba agradecer esta Tesis y dedicar el trabajo realizado, es a mis tres compañeros de laboratorio: Juanfran, Isra y Laura. A Juanfran por haberme enseñado el funcionamiento del laboratorio cuando llegué y por ser un amigo como hay pocos, a pesar de que me meta tanto con Fermín. A Isra por su enorme paciencia y dedicación a la hora de explicarte cualquier duda; con personas así el mundo iría mucho mejor. A Laura por su gran optimismo y sentido del humor, capaz de animarnos a todos en los momentos difíciles, ¡Puxa Asturias!. Muchísimas gracias por vuestra ayuda y amistad, esto va por vosotros.

A mis amigos de Biología, los cuales me han apoyado en todo momento y nunca me han permitido desfallecer por el camino; gracias a mi hermana Maria, a Patricia, Marta, Rut, Mayte, Leyre, Jesús, Ramón, Jaime, Serio y a Javi, aunque sea de Físicas!.

También quisiera agradecer a todos los componentes de Mordor su interés y ánimos recibidos durante este periodo. En especial a mis compañeros de carrera Agustín, Alberto, Nacho y Juancar; al medio-biólogo Javi y a la bióloga de adopción Bárbara.

A mi familia.

A Fernando.

# Índice

<b>Lista de abreviaturas</b>	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>Aspectos generales y clasificación de los antibióticos</b>	17
a) <i>Biosíntesis de la pared celular</i>	17
b) <i>Síntesis proteica</i>	18
c) <i>Replicación y reparación del ADN</i>	19
<b>Antibióticos aminoglicósidos</b>	
• <b>Origen y antecedentes históricos</b>	21
• <b>Estructura</b>	22
• <b>Mecanismo de acción</b>	24
- <i>Entrada al interior celular</i>	25
- <i>Unión al ribosoma</i>	26
• <b>Mecanismos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos</b>	31
a) <i>Disminución de la concentración intracelular de aminoglicósido</i>	32
b) <i>Modificación de la diana ribosomal</i>	
- <i>Metilación del ARNr 16S</i>	33
- <i>Mutaciones en el ribosoma</i>	34
c) <i>Modificación enzimática del aminoglicósido</i>	35
c.1.) <u><i>N-acetiltransferasas</i></u>	36
c.2.) <u><i>O-fosfotransferasas</i></u>	42
c.3.) <u><i>O-adeniltransferasas</i></u>	44
c.4.) <u><i>Enzimas bifuncionales</i></u>	50
• <b>Estrategias para recuperar el uso de los antibióticos aminoglicósidos</b>	51
a) <i>Diseño de nuevos antibióticos aminoglicósidos que escapen a la acción de los EMAs</i>	51
b) <i>Diseño de inhibidores enzimáticos</i>	56



2. OBJETIVOS.....	61
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
1. MATERIALES.....	67
2. MÉTODOS.....	69
2.1. Amplificación del gen <i>aadk</i> , clonación y subclonación	
- Amplificación.....	69
- Clonación en <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</i> .....	70
- Subclonación en <i>pET-28b(+)</i> .....	70
2.2. Sobre-expresión y purificación del extracto de proteínas	
- Sobre-expresión.....	72
- Purificación.....	72
- Análisis de aminoácidos.....	72
- Determinación de la concentración de proteína.....	73
2.3. Eliminación del fragmento de histidinas.....	73
2.4. Fluorescencia.....	74
2.5. Dicroísmo Circular.....	74
2.6. Estudio de autoagregación.....	76
2.7. Ultracentrifugación.....	76
2.8. Determinación de la actividad adeniltransferasa, efecto del pH, del $MgCl_2$ , y de otros iones divalentes, cálculo de parámetros y mecanismo cinético. Estudio de especificidad de sustrato.....	76
2.9. Modelización molecular.....	78
2.10. Determinación de CMI.....	79
2.11. Obtención de estreptidina, estreptidina adenilada y caracterización.....	80
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
• Obtención de la 6-adeniltransferasa de <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> .....	85
• Caracterización bioquímica de la ANT(6)	
- Análisis de aminoácidos.....	89

- <b>Estudios de fluorescencia</b> .....	92
- <b>Estudio de estructura secundaria. Dicroísmo Circular</b> .....	93
<u>Estudio del efecto de diferentes iones divalentes sobre la estructura secundaria de la ANT(6)</u> .....	96
- <b>Estudio de la ANT(6) frente a la temperatura</b> .....	100
<u>Ensayos de desnaturalización</u> .....	100
<u>Ensayos en el ultravioleta lejano</u> .....	101
<u>Ensayos de desnaturalización en presencia de MgCl<sub>2</sub></u> .....	103
<u>Ensayos en el ultravioleta lejano en presencia de MgCl<sub>2</sub></u> .....	106
- <b>Estudio de autoagregación</b> .....	108
- <b>Estudio de ultracentrifugación</b> .....	109
- <b>Estudio de ANT(6) sin colas de histidinas [ANT(6)<math>\Delta</math>His]</b> .....	111
<u>Análisis de la estructura secundaria. Dicroísmo Circular</u> .....	112
<u>Estudio de ultracentrifugación</u> .....	117
- <b>Modelización molecular de la ANT(6)</b> .....	118
<u>1. Búsqueda de homólogos tridimensionales</u> .....	119
<u>2. Búsqueda de homólogos remotos</u> .....	120
2.1. Predicción de la estructura secundaria de la ANT(6).....	121
2.2. Búsqueda de homólogos remotos mediante predicción de plegamiento.....	122
2.3. Alineamiento de secuencias ANT(4')-ANT(6).....	122
<u>3. Modelización de la estructura tridimensional de la ANT(6)</u> .....	125
- <b>Caracterización cinética de la ANT(6)</b> .....	
<u>Efecto del pH en la actividad</u> .....	128
<u>Determinación de los parámetros cinéticos</u> .....	129
<u>Efecto del magnesio en la actividad</u> .....	131
<u>Efecto de diferentes iones divalentes en la actividad</u> .....	132
<u>Determinación del mecanismo cinético</u> .....	133
<u>Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de especificidad por el sustrato aminoglicósido</u> .....	135

<u>Estudios de reconocimiento molecular y especificidad por el</u> <u>nucleótido</u> .....	138
• <b>Recuperación de la actividad antibiótica de la estreptomicina</b>	
- <i>Estudios de reconocimiento molecular de la estreptomicina</i> .....	139
- <i>Obtención y caracterización de estreptidina</i> .....	141
- <i>Estudio in vitro de la estreptidina y determinación de los parámetros</i> <i>cinéticos</i> .....	142
- <i>Estudios in vivo de la estreptidina y de la administración conjunta de</i> <i>estreptomicina y</i> <i>estreptidina</i> .....	145
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	149
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	153

## Lista de abreviaturas

AACs	Aminoglicósido <i>N</i> -acetiltransferasas
ANT(6)	6-adeniltransferasa
ANT(6) $\Delta$ His	6-adeniltransferasa sin cola de histidinas
ANTs	Aminoglicósido <i>O</i> -adeniltransferasas
ATCC	American Type Cell Culture
APHs	Aminoglicósido <i>O</i> -fosfotransferasas
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DC	Dicroísmo Circular
D.O.	Densidad óptica
EMAs	Enzimas modificadores de antibióticos aminoglicósidos
EM(ESI)	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
IDA	Ácido iminodiacético
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
M-H	Mueller-Hinton
O/N	Durante toda la noche
PDB	Protein Data Bank
STD	Diferencia de transferencia de saturación



## **1. INTRODUCCIÓN**



La continua aparición de cepas bacterianas resistentes a muchos de los antibióticos conocidos, así como las escasas perspectivas de introducción de nuevos compuestos bactericidas, se está convirtiendo en uno de los principales problemas con los que se enfrenta la sanidad a nivel mundial (Frechette, 2007).

Hay ejemplos de bacterias resistentes a casi cualquier compuesto antibacteriano del mercado. Esta situación está incentivada por el, en muchos casos, mal uso de los antibióticos en clínica y también por el uso indiscriminado que se ha hecho de estos compuestos en la ganadería intensiva y en la agricultura. Este mal uso ha promovido la supervivencia de bacterias resistentes y además, ha impactado en otras bacterias inocuas originando el desarrollo de cepas resistentes en estas especies (Walsh, 2000).

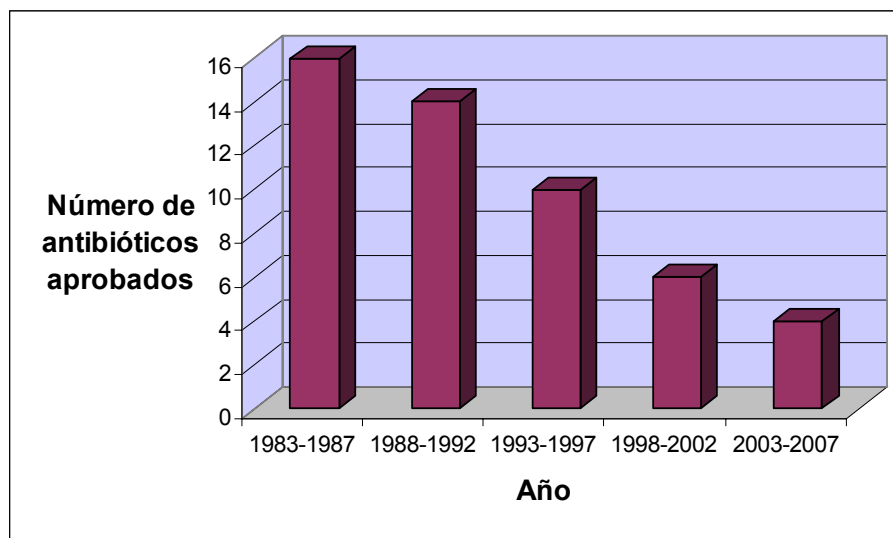
La importancia de esta situación se ha puesto de manifiesto en un estudio reciente en el que se ha mostrado que bacterias procedentes de diversas muestras de suelo eran intrínsecamente resistentes a múltiples antibióticos naturales y sintéticos (D'Costa *et al.*, 2006). De las 480 bacterias analizadas, todas resultaron ser resistentes a antibióticos, incluyendo productos naturales, derivados semisintéticos de éstos y compuestos sintéticos. Este estudio pone de relieve una gran y desconocida reserva de factores de resistencia que podrían ser transferidos a patógenos humanos.

La prevalencia de patógenos resistentes a antibióticos disponibles continua creciendo anualmente. En Estados Unidos, dos millones de pacientes adquieren cada año una infección durante su permanencia en el hospital y aproximadamente 90.000 de estos pacientes mueren como resultado de la infección ("Infectious Diseases Society of America" (IDSA), 2004), ya que más del 70% de los patógenos que ocasionan estas infecciones nosocomiales son resistentes a los fármacos utilizados comúnmente.

Los informes de la IDSA reflejan una disminución en los últimos 20 años en el número de antimicrobianos aprobados por la "Food and Drug Administration" (FDA), con sólo 10 antibióticos aceptados desde 1998 (Figura 1.1). Esto refleja la dificultad de desarrollar nuevos agentes y que la mayoría de programas de desarrollo de nuevos antibióticos de las principales compañías farmacéuticas finalizaron en la pasada década (Norrby *et al.*, 2005). En la actualidad, la



empresa farmacéutica americana tiene menos de 30 antibacterianos en desarrollo clínico, siendo la mayoría versiones de compuestos ya conocidos (IDSA, 2004; PhRMA Survey, 2004).



**Figura 1.1.** Antibióticos aprobados durante 1983-2007. Modificado de Spellberg *et al.*, 2004 y Fox, 2006.

Sin embargo, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos tipos de antibióticos o revitalizar aquellos ya existentes (Tan *et al.*, 2000). Una de las estrategias que se pueden emplear para solucionar el problema de la resistencia, es el desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos que inhiban dianas bioquímicas de la bacteria desconocidas anteriormente. Pero mientras el descubrimiento de nuevos inhibidores y dianas es un objetivo abordable, el desarrollo con éxito de nuevos agentes antibacterianos ha resultado ser tremendamente difícil (Payne *et al.*, 2007).

Otra opción para combatir el problema de la resistencia es la “terapia combinada”. La combinación de dos antibióticos, o antibióticos junto con adyuvantes se está convirtiendo en una aproximación terapéutica prometedora (Cottarel y Wierzbowski, 2007).

## **Aspectos generales y clasificación de los antibióticos.**

En 1942 Selman A. Waksman introduce el término antibiótico, del griego anti (*contra*) y bios (*vida*), definiéndolo como “*aquellas sustancias químicas producidas por microorganismos que, a bajas concentraciones, inhiben el desarrollo o destruyen la vida de otros microorganismos*”. Esta definición, que hace referencia a los antibióticos naturales como la penicilina, se amplió para incluir moléculas con actividad similar obtenidas por síntesis química como las sulfamidas, o semisintéticas como la ampicilina. Los antibióticos pueden actuar matando a las bacterias (bactericidas), o inhibiendo su crecimiento y multiplicación (bacteriostáticos).

Al descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929, le siguió el descubrimiento y uso clínico de las sulfonamidas en la década de los 30 (Conly y Johnston, 2005). Durante la década de los 40 los antibióticos  $\beta$ -lactámicos revolucionaron la medicina, y se convirtieron en el factor más importante para aumentar la esperanza de vida en la población mundial (Bax *et al.*, 2000). Eran considerados “fármacos milagrosos”, ya que eliminaban las bacterias sin ocasionar un daño excesivo a las células eucariotas del individuo tratado.

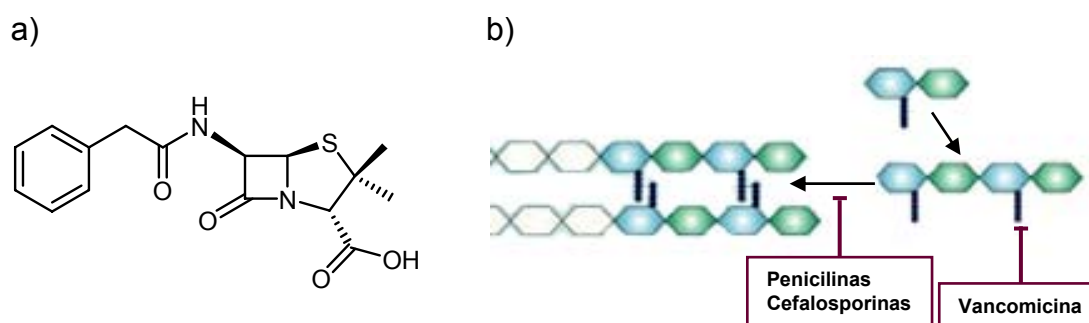
Los antibióticos se clasifican habitualmente según su diana y su mecanismo de acción, dividiéndose en tres grandes grupos (Walsh, 2000; Wong y Ritter, 2001):

- a) *Aquellos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular.*
- b) *Los que alteran la síntesis proteica bacteriana.*
- c) *Los que perturban la replicación y reparación del ADN bacteriano.*

- a) *Antibióticos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular.*

La pared celular proporciona a la envuelta bacteriana la rigidez necesaria para sobrevivir en ambientes hipotónicos, además de conferir a la bacteria su forma característica. Está compuesta por una serie de polisacáridos y de polipéptidos que forman el peptidoglicano o mureína. Debido a la importancia de la pared celular para la viabilidad de la bacteria y a que no existe su

homólogo en células eucariotas, los antibióticos que desestabilizan su integridad se han utilizado en clínica durante décadas. Entre ellos destacan los  $\beta$ -lactámicos penicilinas y cefalosporinas (Figura 1.2a), cuya diana de acción es un enzima con actividad transpeptidasa que se encarga de alargar la cadena de peptidoglicano (Spratt y Cromie, 1988) (Figura 1.2b). Como resultado de la acción del antibiótico, la capa de peptidoglicano se vuelve más débil y susceptible a lisis frente a cambios de la presión osmótica. Además de las penicilinas y cefalosporinas, la vancomicina (perteneciente al grupo de los antibióticos de tipo glicopeptídico) actúa sobre la pared celular secuestrando los péptidos que ejercen como sustratos de enzimas transpeptidasas y transglicosilasas (Williams, 1996) (Figura 1.2b), por lo que el ensamblaje del peptidoglicano es defectuoso. La acción combinada de  $\beta$ -lactámicos y vancomicina produce un efecto sinérgico, ya que ambos actúan sobre pasos consecutivos (enzima y sustrato).

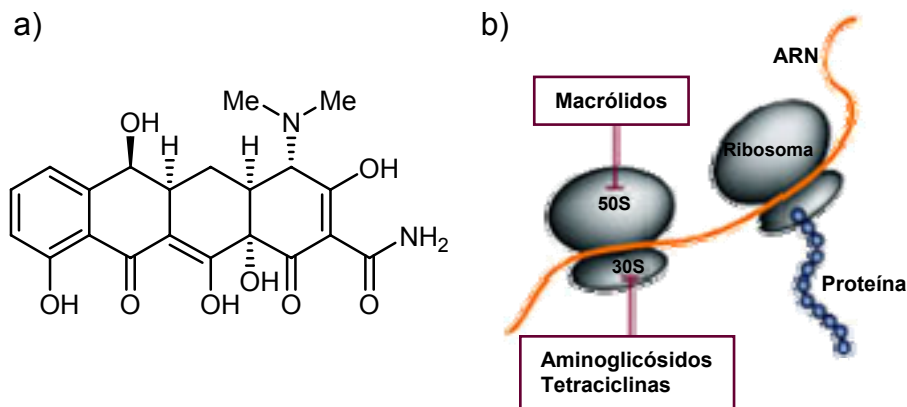


**Figura 1.2.** a) Estructura química de la penicilina G. b) Esquema del mecanismo de acción de antibióticos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular. Las unidades de peptidoglicano se representan como hexágonos (*N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetil-murámico). Las cadenas de péptidos se representan de color azul oscuro. Modificado de Walsh, 2003.

#### *b) Antibióticos que alteran la síntesis proteica.*

La maquinaria traduccional procariota es la diana de la mayoría de antibióticos. Probablemente esto sea debido a la complejidad del ribosoma, que lo hace vulnerable en muchos aspectos, además de ser lo suficientemente distinto de su análogo eucariota. Los antibióticos que actúan a este nivel son los macrólidos, las tetraciclinas (Figura 1.3a) y los aminoglicósidos (Figura 1.3b). Los macrólidos estimulan la disociación del peptidil-ARNt del ribosoma

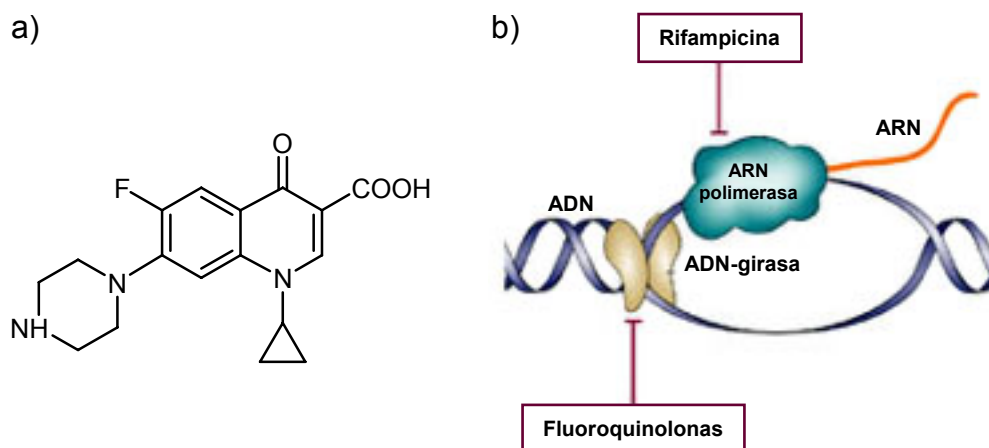
durante la translocación, por lo que la cadena polipeptídica naciente deja de elongarse prematuramente (Hansen *et al.*, 1999), las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano bloqueando la fijación del aminoacil-ARNt al sitio aceptor del complejo formado por el ARNm y la subunidad 50S del ribosoma, mientras que la unión de los aminoglicósidos al ribosoma provoca la incorporación de aminoácidos incorrectos en la cadena polipeptídica naciente, dando lugar a proteínas erróneas que se acumulan en la célula, induciendo la muerte de la bacteria (Fourmy *et al.*, 1996).



**Figura 1.3.** a) Estructura química de la tetraciclina. b) Esquema del mecanismo de acción de antibióticos que afectan a la síntesis proteica. Modificado de Walsh, 2003.

c) *Antibióticos que interfieren en la replicación y reparación del ADN.*

Las fluoroquinolonas (Figura 1.4a) son antibióticos sintéticos cuya diana de acción es la ADN-girasa (Shen *et al.*, 1989). Este enzima es una topoisomerasa de tipo II que actúa durante la replicación del ADN para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento (Figura 1.4b). La ADN-girasa produce cortes en la doble cadena y después los une. La acción de este tipo de antibióticos impide que el enzima vuelva a ligar las cadenas de ADN cortadas, acumulándose cortes en el ADN y dando lugar a la muerte celular.



**Figura 1.4.** a) Estructura química de la ciprofloxacina, una fluoroquinolona. b) Mecanismo de acción de antibióticos que alteran la replicación del ARN y ADN. Modificado de Walsh, 2003.

Aparte de los tres grandes grupos anteriormente citados, existen otros tipos de antibióticos con diferentes dianas de acción, como las sulfonamidas que actúan inhibiendo el metabolismo del ácido fólico, la rifampicina que inhibe al enzima ARN-polimerasa suprimiendo la síntesis de ARNm (Figura 1.4b) y las polimixinas que alteran la integridad de la membrana celular.

De entre todos los grupos de antibióticos, los aminoglicósidos se encuentran entre aquellos de amplio espectro más usados en clínica a lo largo de varias décadas, y actúan frente a infecciones producidas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La mayoría de los aminoglicósidos son bactericidas, tienen una farmacocinética predecible, y al actuar en sinergia con otros antibióticos les hace altamente valiosos en tratamientos anti-infecciosos (Kotra *et al.*, 2000).

## Antibióticos aminoglicósidos.

- **Origen y antecedentes históricos.**

Los aminoglicósidos se aislaron por primera vez de muestras de suelo a partir de diversas especies de *Micromonospora* y *Streptomyces* (Greenwood, 1995). Se postula que estos compuestos se originaron como intermediarios de algunas rutas biosintéticas de la bacteria.

La estreptomicina fue el primer aminoglicósido descubierto por Waksman y colaboradores en 1944 a partir de un cribado sistemático de sobrenadantes de cultivos bacterianos buscando actividad inhibitoria frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Schatz y Waksman, 1944). Esta molécula resultó ser el primer agente efectivo en el tratamiento de la tuberculosis y, después de la penicilina, el segundo compuesto de esta clase empleado en terapia. Pero sólo unos años más tarde, tras la introducción de este nuevo agente en quimioterapia antibacteriana humana, comenzaron a aparecer microorganismos resistentes a estreptomicina.

El siguiente aminoglicósido descubierto fue la neomicina, hallada en paralelo por los grupos de Waksman y Umezawa en 1949 (Umezawa *et al.*, 1948; Umezawa *et al.*, 1949; Waksman y Lechavelier, 1949). La neomicina se ha usado específicamente como aplicación tópica debido a su pobre biodisponibilidad oral y penetración celular, además de presentar una alta nefro- y ototoxicidad.

La paromomicina se descubrió en 1956, pero no era lo suficientemente potente como para darle un uso sistémico. La situación cambió en 1957 con el descubrimiento de la kanamicina por parte del grupo de Umezawa (Umezawa *et al.*, 1957). Este aminoglicósido, producido por *Streptomyces kanamyceticus*, resultó ser un antibiótico bien tolerado por vía parenteral a pesar de no ser completamente inocuo, y se ha usado ampliamente en infecciones causadas por bacterias resistentes, incluyendo aquellas resistentes a estreptomicina. Sin embargo, debido a su uso extendido, en 1965 comenzaron a aparecer las primeras cepas resistentes.

La gentamicina aislada de *Micromonospora* en 1963 por Weinstein y colaboradores, constituyó un avance significativo en el tratamiento de

infecciones causadas por bacterias Gram-negativas, siendo muy activa frente a éstas, y muy bien tolerada (Weinstein *et al.*, 1967).

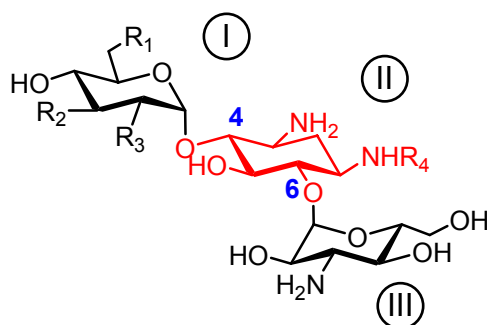
El éxito en clínica de la gentamicina, propició la búsqueda de antibióticos similares, como la tobramicina, sisomicina, lividomicina, ribostamicina y verdomicina durante el periodo de 1968 a 1972. De todos ellos, sólo la tobramicina y la sisomicina se han usado en terapia clínica. Poseen un espectro de acción similar al de la gentamicina, resultando incluso más activos frente a algunas cepas bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*.

Los antibióticos semisintéticos amikacina (derivado de la kanamicina), dibekacina (derivado de la kanamicina B), isepamicina (derivado de la gentamicina B) y netilmicina (derivado de la sisomicina) se introdujeron durante la década de los 70 para tratar de evitar los problemas de resistencia bacteriana originados por el uso de los correspondientes antibióticos naturales (Mitscher, 2002). La arbekacina, un derivado de la kanamicina B utilizado en Japón desde 1990, es el aminoglicósido más reciente introducido en clínica (Kondo y Hotta, 1999).

- **Estructura.**

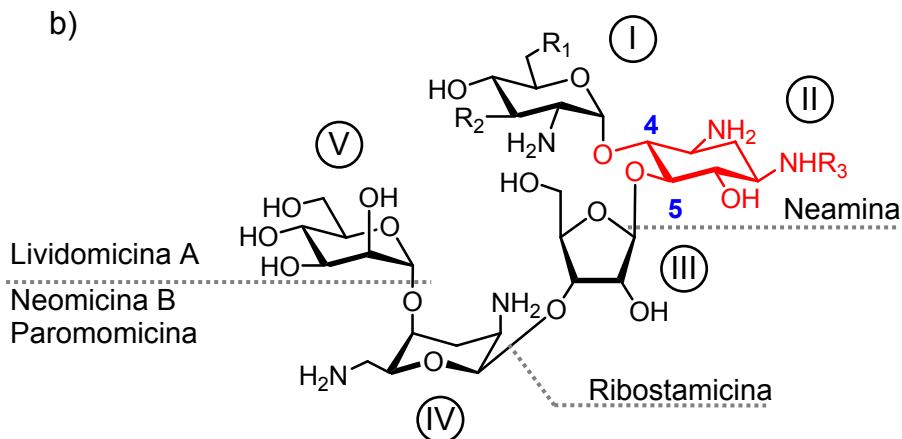
Los aminoglicósidos poseen un esqueleto estructural consistente en un anillo aminociclitol saturado con sustituciones de tipo hidroxilo y amino. Este anillo aminociclitol está conectado a través de enlaces glicosídicos a varios aminoazúcares. En la mayoría de los aminoglicósidos usados en clínica, la molécula de aminociclitol se trata de la 2-desoxiestreptamina, que puede estar disustituida en las posiciones relativas 4,5 (como por ejemplo en la neomicina, paromomicina y ribostamicina), o en 4,6 (kanamicina, tobramicina y gentamicina, entre otros) (Figura 1.5). En la nomenclatura actual, el anillo I (generalmente un anillo de glucosamina común a la mayoría de aminoglicósidos) es el que está unido a la posición 4 de la 2-desoxiestreptamina, que se nombra como anillo II, y el anillo III es el otro aminoazúcar unido a la posición 5 o 6 del anillo II. El anillo IV se corresponde con cualquier anillo adicional unido al anillo III (Magnet y Blanchard, 2005).

a)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Kanamicina A	NH <sub>2</sub>	OH	OH	H
Kanamicina B	NH <sub>2</sub>	OH	NH <sub>2</sub>	H
Tobramicina	NH <sub>2</sub>	H	NH <sub>2</sub>	H

b)

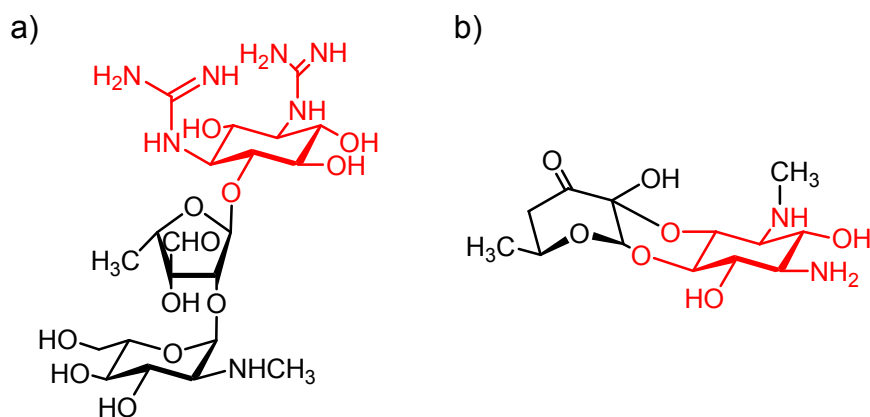


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Neamina	NH <sub>2</sub>	OH	H
Ribostamicina	NH <sub>2</sub>	OH	H
Neomicina B	NH <sub>2</sub>	OH	H
Paromomicina	OH	OH	H
Lividomicina A	OH	H	H

**Figura 1.5.** Estructura química de antibióticos aminoglicósidos. El anillo de 2-desoxiestreptamina se muestra en rojo. a) Aminoglicósidos 4,6-disustituidos. b) Aminoglicósidos 4,5-disustituidos.



Sin embargo, algunos aminoglicósidos no presentan la estructura general anteriormente descrita. Por ejemplo, la estreptomicina posee un anillo de estreptidina como aminociclitol central y la espectinomicina presenta un anillo aminociclitol de actinamina (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** a) Estructura química de la estreptomicina. b) Estructura química de la espectinomicina. El anillo de estreptidina y actinamina se muestra en rojo respectivamente.

La estructura de los aminoglicósidos es fundamental a la hora de entender sus propiedades químicas. Son compuestos básicos, altamente polares y cargados positivamente. Son muy solubles en agua y relativamente insolubles en lípidos. Su naturaleza catiónica contribuye a su actividad antibacteriana. Debido a su carga positiva, son capaces de unirse al lipopolisacárido cargado negativamente de la pared bacteriana de especies Gram-negativas y a una variedad de moléculas aniónicas intracelulares y de la membrana celular, como el ADN, ARN y fosfolípidos. Sin embargo, su carga positiva a pH fisiológico también contribuye a su toxicidad (ototoxicidad, nefrotoxicidad y bloqueo neuromuscular). Los aminoglicósidos son compuestos metabólicamente estables que son eliminados inalterados en orina (Jana y Deb, 2006).

- **Mecanismo de acción.**

La actividad bactericida de los antibióticos aminoglicósidos se debe a la unión al ribosoma bacteriano, ocasionando la síntesis de proteínas erróneas que se acumulan en la membrana celular, produciendo una alteración en su integridad y, en último término, la muerte celular (Gale *et al.*, 1981). Pero a

pesar del gran progreso que se ha realizado en los últimos años en elucidar los detalles de la interacción de los antibióticos aminoglicósidos con el ribosoma y su consecuente influencia en la maquinaria traduccional, existen aún muchos aspectos desconocidos de la interacción del aminoglicósido y la célula bacteriana.

- *Entrada al interior celular.*

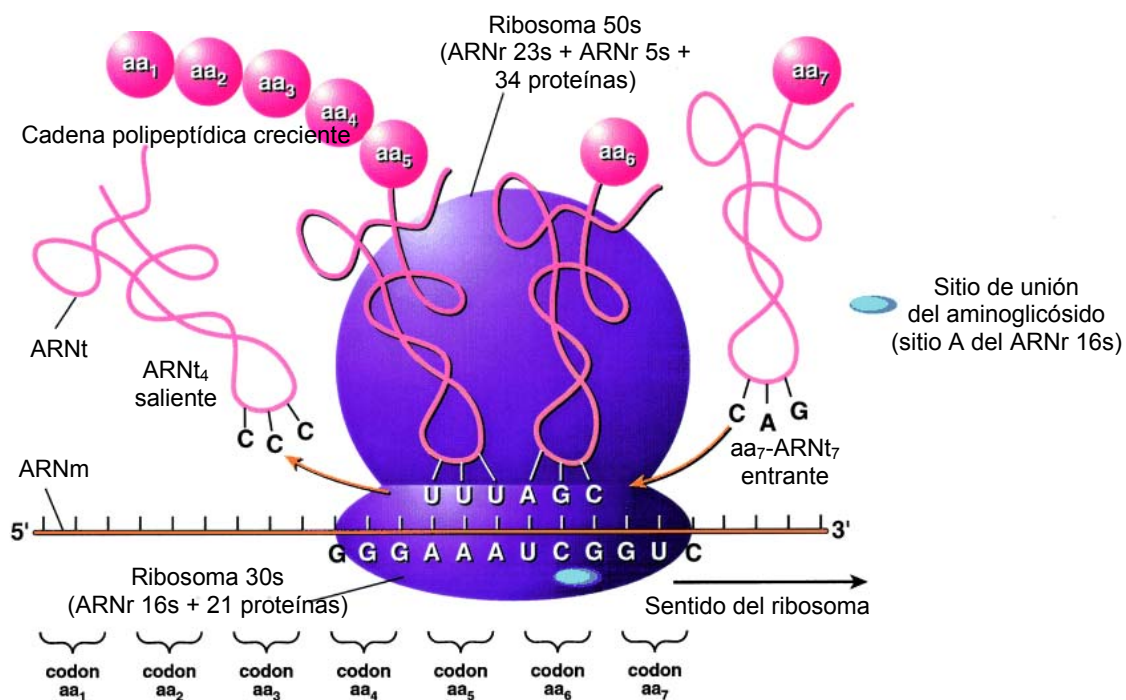
Se ha propuesto que los antibióticos aminoglicósidos penetran en bacterias aerobias en varios pasos consecutivos (Hancock, 1984; Davis, 1987; Taber *et al.*, 1987):

En primer lugar, los antibióticos aminoglicósidos se unen electrostáticamente a residuos cargados negativamente de la membrana externa bacteriana. En el caso de bacterias Gram-negativas, se unen a fosfolípidos y lipopolisacáridos y en el de Gram-positivas, a fosfolípidos y ácidos teicoicos (Taber *et al.*, 1987). Este proceso es pasivo, es decir, no-dependiente de energía (Hancock *et al.*, 1991). Se cree que la unión de los aminoglicósidos da lugar a un desplazamiento de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  que unen las moléculas de lipopolisacárido adyacentes, ocasionando un daño en la membrana externa y aumentando su permeabilidad (Hancock, 1984; Martin y Beveridge, 1986). Los antibióticos aminoglicósidos difunden a través de canales de porina presentes en la membrana externa y entran en el espacio periplásmico. Para que se de el transporte a través de la membrana citoplasmática se requiere energía procedente de la cadena de transporte de electrones en un proceso dependiente de oxígeno, por lo que a esta fase se le ha denominado Fase Dependiente de Energía I (FDE-I). Esto explicaría el por qué microorganismos deficientes en sistemas de transporte de electrones, como los anaerobios, son resistentes a los antibióticos aminoglicósidos (Bryan *et al.*, 1979). Durante la FDE-I, sólo una cantidad baja de antibiótico atraviesa la membrana citoplasmática (Bryan y van den Elzen, 1977; Damper y Epstein, 1981). La unión de los aminoglicósidos al ribosoma —como detallaremos más adelante— da lugar a fallos en el proceso de traducción del ARNm, produciendo proteínas aberrantes. Algunas de estas proteínas son incorporadas en la membrana citoplasmática, dando lugar a la pérdida de su

integridad. Este suceso desencadena una serie de acontecimientos que se denominan Fase Dependiente de Energía II (FDE-II) (Bryan y Kwan, 1983). En ella, más cantidad de antibiótico aminoglicósido es transportado a través de la membrana plasmática dañada. Como consecuencia, el antibiótico se acumula rápidamente en el citoplasma saturando los ribosomas y provocando la muerte celular (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

#### - Unión al ribosoma.

La diana biológica concreta de los antibióticos aminoglicósidos se localiza en el denominado sitio A (sitio de unión del aminoacil-ARNt) de la subunidad ribosómica 16S (Moazed y Noller, 1987) (Figura 1.7). Esta región del ribosoma juega un papel fundamental en el proceso de traducción (Cunningham *et al.*, 1992; Cunningham *et al.*, 1993).



**Figura 1.7.** Síntesis de proteínas en el ribosoma y lugar de unión de los antibióticos aminoglicósidos. Modificado de Ritter y Wong, 2001.

Durante la traducción, el ARNm forma un par codón-anticodón con el aminoacil ARNt portador del aminoácido a incorporar en la cadena polipeptídica naciente. El ARNm y el ARNt interaccionan formando una mini-hélice de tres pares de bases con apareamiento tipo Watson-Crick. Como es lógico, aquellos

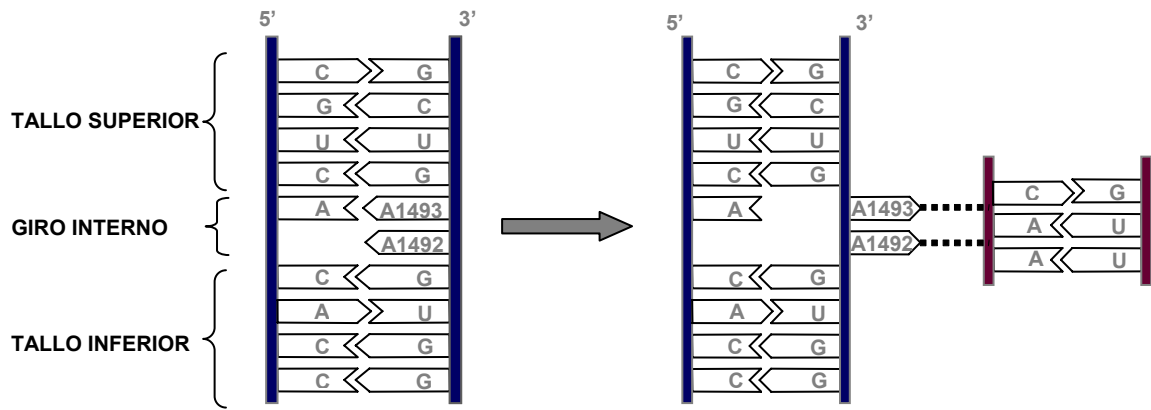
pares codón-anticodón que no presenten la complementariedad adecuada darán lugar a un complejo significativamente menos estable que aquellos que presenten una complementariedad total, lo que contribuye a la fidelidad del proceso de traducción. Sin embargo, este mecanismo por sí sólo, no es capaz de garantizar una fidelidad suficiente. De hecho, si la fidelidad del proceso de traducción se apoyase exclusivamente en criterios energéticos como el anteriormente expuesto (es decir, en la diferencia de estabilidad entre los pares codón-anticodón correctos y los incorrectos), la tasa de errores introducidos en la traducción sería muy superior a la observada experimentalmente. Existen, por lo tanto, mecanismos adicionales para asegurar la correcta traducción de la información contenida en el ARNm. El sitio A forma parte del mecanismo fundamental de verificación de errores del ribosoma y tiene, como principal función, evitar la introducción de aminoácidos incorrectos en la cadena polipeptídica naciente.

Davies y colaboradores fueron los primeros en sugerir que la estreptomicina podría interferir en la biosíntesis de proteínas, al interaccionar con el complejo ribosoma-ARNm, alterando el proceso de traducción (Davies *et al.*, 1964). Estudios posteriores pusieron de manifiesto que los antibióticos aminoglicósidos alteran la síntesis proteica al inducir fallos en la lectura del codón e inhibiendo la translocación (Davies *et al.*, 1965; Davies y Davis, 1968). Unos veinte años más tarde, Moazed y Noller mostraron que la neomicina y aminoglicósidos relacionados se unían a secuencias conservadas filogenéticamente del ARNr 16S, que forma parte de los sitios de unión aminoacil-ARNt (sitio A) y peptidil-ARNt (sitio P) en la subunidad ribosomal 30S (Moazed y Noller, 1986; Moazed y Noller, 1987). También se llevaron a cabo experimentos de modificación química en el ribosoma que indicaban que los aminoglicósidos de la clase de la neomicina protegen los nucleótidos del sitio A de la reacción con sondas químicas (Moazed y Noller, 1990; Woodcock *et al.*, 1991).

En 1996 se describió la estructura en disolución correspondiente al complejo entre el sitio A y la paromomicina (Fourmy *et al.*, 1996). Posteriormente, en el año 1998 se determinó la estructura del complejo entre la misma diana del ARN y la gentamicina (Yoshizawa *et al.*, 1998). En el año 2000, se resolvieron con métodos de difracción de rayos-X dos estructuras

cristalográficas de la subunidad ribosomal 30S del microorganismo *Thermus thermophilus* a una resolución de 3.3 Å y 3 Å respectivamente (Schlueder et al., 2000; Winberg et al., 2000), y otra procedente del microorganismo *Haloarcula marismortui* a una resolución de 2.4 Å (Ban et al., 2000). Así mismo, se resolvió la estructura de la subunidad 30S en complejo con los antibióticos estreptomicina, paromomicina y espectinomicina (Carter et al., 2000). Todos estos estudios junto con las estructuras conocidas de los constituyentes del ribosoma obtenidas por resonancia magnética nuclear (Fourmy et al., 1998a; Fourmy et al., 1998b; Yoshizawa et al., 2002), ofrecen una información muy valiosa del proceso de traducción y de los mecanismos moleculares de acción, incluyendo las características de afinidad y especificidad de la interacción aminoglicósido-ribosoma bacteriano. En los últimos años, otros complejos aminoglicósido-sitio A han sido descritos mediante difracción de rayos-X, proporcionando por primera vez, comprensión a nivel estructural de cómo ejerce su acción esta familia de antibióticos (Francois et al., 2005; Vicens y Westhof, 2003a; Vicens y Westhof, 2003b).

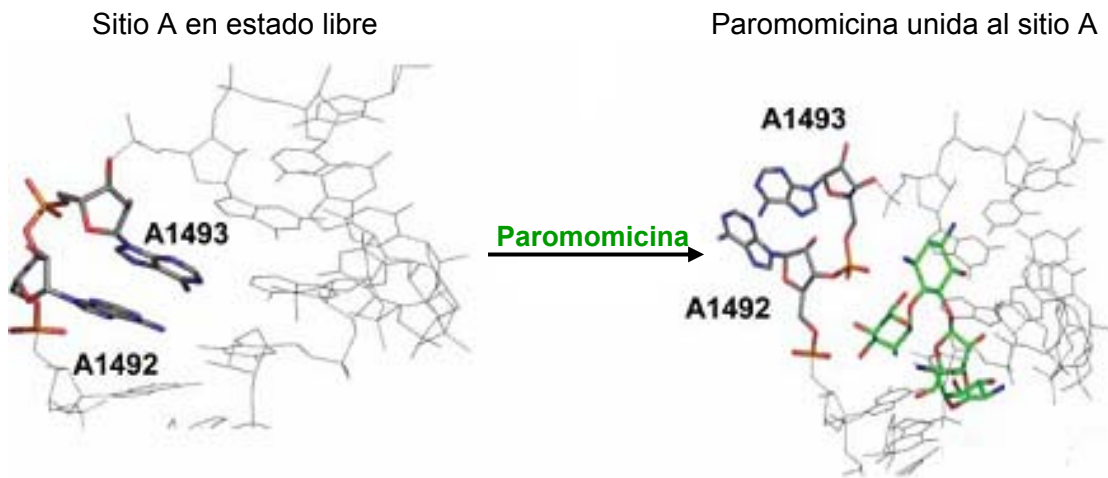
La región clave del sitio A, en lo referente a la acción biológica de los aminoglicósidos, se localiza entre los nucleótidos en posiciones 1400-1410 y 1490-1500. Esta porción de ARN está constituida por un giro interno asimétrico, flanqueado por dos porciones de doble hélice, denominadas tallo superior e inferior (Vicens y Westhof, 2003b) (Figura 1.8). Las adeninas 1492 y 1493, localizadas en el giro interno, juegan un papel fundamental en el proceso de verificación de errores (Moazed y Noller, 1990; Noller, 1991; Purohit y Stern, 1994; Yoshizawa et al., 1999). Estos residuos se encuentran inicialmente en el interior de la doble hélice de ARN. Sin embargo, en presencia de un par codón-anticodón correcto, el sitio A experimenta un cambio conformacional significativo en el que los residuos A1492 y A1493 se orientan fuera de la doble hélice e interaccionan con el surco menor del par codón-anticodón (Doherty et al., 2000; Nissen et al., 2001; Ogle et al., 2001) (Figura 1.8). Este cambio conformacional estabiliza el complejo y permite que el proceso de traducción siga su curso (Pape et al., 2000; Rodnina y Wintermeyer, 2001; Stahl et al., 2002).



**Figura 1.8.** Representación esquemática del sitio-A en estado libre y en presencia de un par codón-anticodón. Los residuos de adenina localizados en las posiciones 1492 y 1493 interactúan con el surco menor de la mini hélice de tres pares de bases constituida por el par codón-anticodón.

Por el contrario, si el par codón-anticodón no tiene la complementariedad correcta, su interacción con los residuos de adenina previamente mencionados sería defectuosa. Por lo tanto, el cambio conformacional en el sitio A no se produciría y el aminoácido que porta el ARNt no se incorpora en el polipéptido naciente.

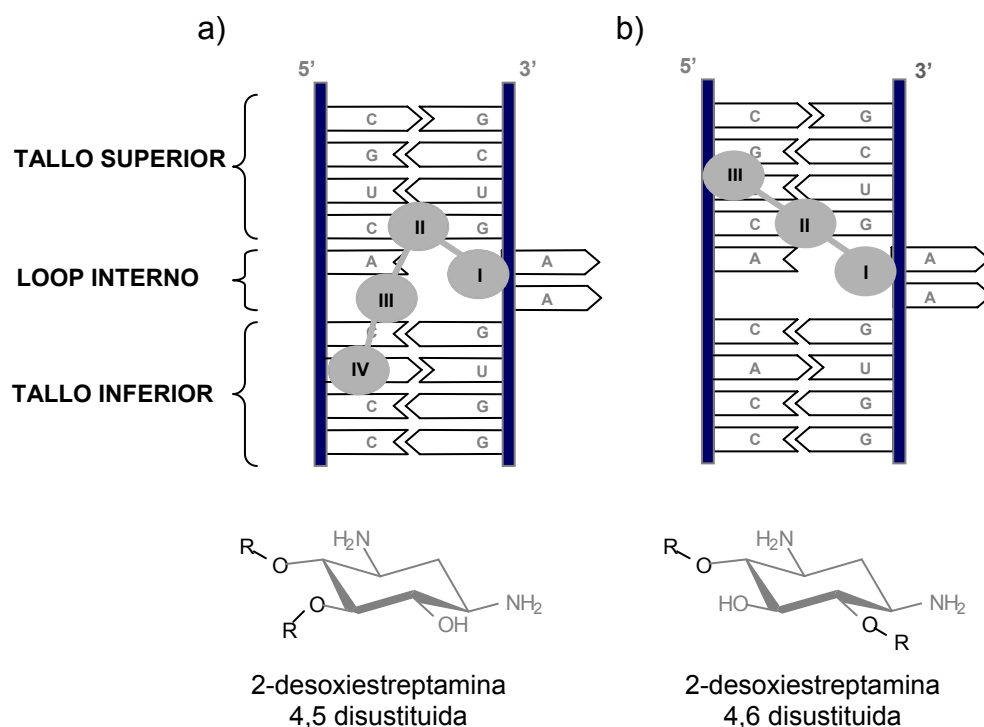
Los estudios estructurales realizados hasta la fecha demuestran que los antibióticos aminoglicósidos se unen al sitio A induciendo en éste un cambio conformacional análogo al observado en presencia de un par codón-anticodón correcto. Así, el antibiótico se inserta en el surco mayor del ARN desplazando los residuos A1492 y A1493, que quedan expuestos en la zona exterior de la hélice (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** La unión de la paromomicina en el sitio A desplaza los residuos A1492 y A1493 hacia el exterior de la hélice. Modificado de Hainrichson *et al.*, 2007.

Como consecuencia de la interacción con el antibiótico, el ARN adopta una conformación de alta afinidad por el complejo codón-anticodón. Esto disminuye su capacidad de discriminar los pares codón-anticodón correctos de los incorrectos lo que afecta a la fidelidad del proceso de traducción (Pape *et al.*, 2000; Rodnina *et al.*, 2002).

A pesar de las diferencias estructurales, las distintas familias de aminoglicósidos conservan rasgos comunes en su interacción con el ARN (Vicens y Westhof, 2001; Vicens y Westhof, 2002; Vicens y Westhof, 2003a). Así, tanto en aminoglicósidos que poseen una unidad de 2-desoxiestreptamina sustituida en las posiciones 4 y 5 (paromomicina, neomicina, ribostamicina, etc.), como en aquellos en los que las sustituciones son en 4 y 6 (kanamicina, tobramicina, gentamicina, etc.), los anillos I y II adoptan una posición similar en el surco mayor, dando lugar a interacciones prácticamente idénticas con el ARN (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** a) Representación esquemática de la disposición de la paromomicina en el centro de reconocimiento del sitio A. Los anillos III y IV interaccionan con el tallo inferior del ARN. b) Representación esquemática de la disposición de la gentamicina en el centro de reconocimiento del sitio A. El anillo III interacciona con el tallo superior del ARN.

Si bien diversos estudios han establecido que los anillos I y II constituyen el fragmento mínimo de antibiótico necesario para obtener una unión específica al sitio A (Fourmy *et al.*, 1996), la estabilidad de los complejos, así como la especificidad de la interacción, se ve incrementada, en gran medida por la presencia de los anillos III y IV, en el caso de la paromomicina y neomicina (Figura 1.10a) y del anillo III, en el caso de la gentamicina y kanamicina (Figura 1.10b).

El efecto más significativo de esta inserción del anillo I en el surco mayor del ARN es el desplazamiento, hacia el surco menor, de los residuos A1492 y A1493, que quedan totalmente expuestos hacia el exterior de la hélice. Tal como se ha mencionado anteriormente, en este cambio conformacional está el origen de la actividad antibiótica.

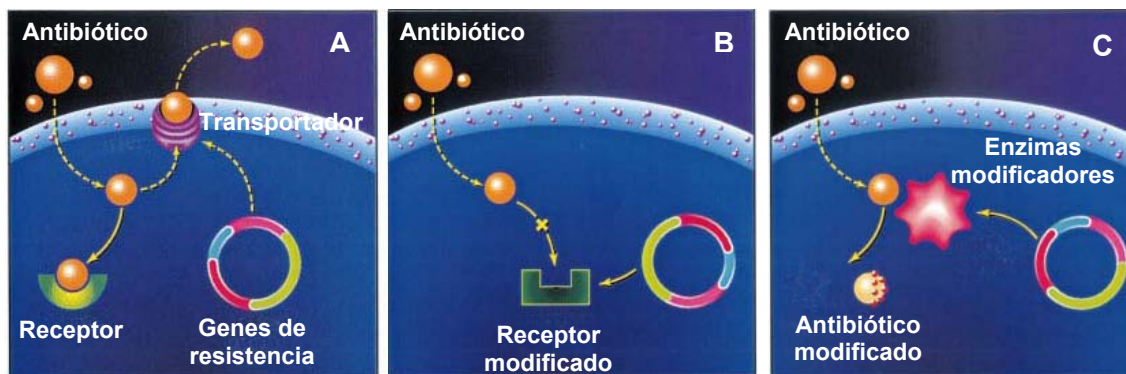
- ***Mecanismos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos.***

A lo largo de millones de años, las cepas bacterianas han estado desarrollando una batalla en su ambiente, produciendo compuestos específicos y tóxicos para otras bacterias. Sin embargo, estos compuestos no son tóxicos para la bacteria que los origina. Esto se debe a que han desarrollado en paralelo mecanismos de defensa, tal como la producción de enzimas que desactivan estos compuestos. Así, la bacteria que produce toxinas y es inmune a sus efectos, posee una ventaja evolutiva frente a los otros microorganismos de su entorno (Smith y Baker, 2002). En respuesta a este hecho, estos organismos han ido incorporando a lo largo del tiempo algunos de los genes que codifican para dichos enzimas en sus genomas, por lo que ellos también adquieren la ventaja de desactivar los compuestos de otras bacterias. Este proceso está facilitado por el hecho de que los genes que codifican para estos enzimas se encuentran fundamentalmente en plásmidos y transposones (Arthur y Courvalin, 1993; Davies, 1994).

Los aminoglicósidos fueron de los primeros grupos de antibióticos a los que se desarrolló resistencia (Wright, 1999). Existen tres mecanismos que confieren resistencia frente a antibióticos aminoglicósidos (Vakulenko y Mobashery, 2003; Magnet y Blanchard, 2005; Wright, 2005) (Figura 1.11):



- a) *Disminución de la concentración intracelular de aminoglicósido.*
- b) *Modificación de la diana ribosomal.*
- c) *Modificación enzimática del aminoglicósido.*



**Figura 1.11.** Mecanismos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos: A) Disminución de la concentración intracelular de antibiótico; B) Modificación de la diana biológica; C) Modificación enzimática del antibiótico. Modificado de Ritter y Wong, 2001.

Cabe destacar que para el caso de ciertos aminoglicósidos, algunas cepas bacterianas ponen en funcionamiento más de un mecanismo de resistencia a la vez.

- a) *Disminución de la concentración intracelular de aminoglicósido.*

La concentración de aminoglicósido puede disminuir en el interior celular debido a la reducción del paso de compuesto al interior, a la activación de un transportador que lo elimine, o a la acción de ambos (Hatch y Schiller, 1998).

La eliminación de antibiótico dependiente de energía es una de las mayores causas de resistencia. Esto se manifiesta, sobre todo, en los patógenos oportunistas y multirresistentes que ocasionan infecciones nosocomiales, y que han de desarrollarse en un medio en el que existe una presencia constante de antibiótico. El transportador bacteriano que elimina el antibiótico es dependiente de energía y, tal como hemos mencionado anteriormente, las bacterias anaerobias son intrínsecamente resistentes a los aminoglicósidos. Además, mutantes de la cadena respiratoria o cepas que poseen mutantes funcionales de ATP-sintasas, exhiben una susceptibilidad menor a los aminoglicósidos (Millar *et al.*, 1980; Taber *et al.*, 1987). Las especies

bacterianas que expresan constitutivamente estos transportadores son intrínsecamente resistentes a niveles bajos de diferentes antibióticos. Mutaciones en los genes que codifican para estos transportadores o la inducción de su expresión en presencia de sustrato, puede dar lugar a la sobreexpresión del gen constitutivo, o silenciado, del transportador (Aires *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 2000). Se pensaba que estos transportadores eran específicos de compuestos hidrofóbicos o anfipáticos, y que los aminoglicósidos no estarían afectados por este mecanismo de resistencia. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que los aminoglicósidos son sustratos de varios transportadores, incluyendo miembros de las cinco superfamilias de transportadores bacterianos (Putman *et al.*, 2000).

Cambios en los componentes de membrana involucrados en la unión electrostática inicial del aminoglicósido, se han asociado al aumento en los niveles de resistencia, especialmente en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Bryan *et al.*, 1984). El alginato extracelular producido por las cepas mucoides de *P. aeruginosa*, causa la disminución de la entrada y del efecto bactericida inicial del antibiótico, por lo que se ha propuesto que este alginato polianiónico viscoso podría funcionar como una barrera física al compuesto (Hatch y Schiller, 1998).

#### *b) Modificación de la diana ribosomal.*

##### - Metilación del ARNr 16S.

Muchos microorganismos productores de aminoglicósidos expresan ARNr-metilasa capaces de modificar el ARNr 16S en posiciones fundamentales para la unión del antibiótico, con el fin de sobrevivir a la acción de los compuestos que ellas mismas originan (Cundliffe, 1989). Las correspondientes ARNr-metiltransferasas constituyen la familia de las metiltransferasas que confieren resistencia a antibióticos aminoglicósidos, y se han caracterizado algunas de ellas. La ARNr-metiltransferasa KamA de *Streptomyces tenjimariensis* y la KamB de *Streptomyces tenebrarius* catalizan la modificación de la adenina en posición 1408, que confiere resistencia a kanamicina, tobramicina, sisomicina y apramicina (Skeggs *et al.*, 1985; Cundliffe, 1989). La ARNr-metiltransferasa

GmrA, del productor de gentamicina *Micromonospora purpurea*, y la KgmB de *S. tenebrarius*, catalizan la modificación de la guanina 1405, confiriendo resistencia a las desoxiestreptaminas 4,6-disustituidas (Thompson *et al.*, 1985; Cundliffe, 1989; Doi *et al.*, 2004). Presumiblemente, la metilación de estos nucleótidos inhibe los contactos intermoleculares que realizan con el antibiótico.

Hasta hace unos años, se pensaba que los genes que codifican para las metiltransferasas del ARNr 16S eran exclusivos de los microorganismos productores de aminoglicósidos. Sin embargo, tres trabajos de los años 2003 y 2004 describen la caracterización de genes similares en muestras clínicas aisladas de patógenos humanos Gram-negativos (Galimand *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 2004). Los enzimas para los que codifican, confieren resistencia a la mayoría de aminoglicósidos usados en clínica, y poseen una gran similitud de secuencia primaria con las metilasas del ARNr 16S de cepas de *Actinomyce*, lo que sugiere una posible transferencia génica desde el microorganismo productor a los patógenos Gram-negativos. Debido a que estas metilasas pueden modificar cualquier copia de ARNr 16S y conferir un nivel alto de resistencia a casi cualquier compuesto, la aparición de este mecanismo de resistencia en patógenos humanos es un grave problema a tener en cuenta, sobre todo considerando que estos genes pueden ser diseminados fácilmente.

#### - Mutaciones en el ribosoma.

La resistencia a antibióticos aminoglicósidos debida a la mutación de la diana ribosomal es sólo relevante en clínica en el caso de la estreptomicina y *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium* es el único género de eubacterias con especies que poseen una única copia del operón ribosomal. Esto implica que una sola mutación puede dar lugar a la producción de una población homogénea de ribosomas mutados, y por lo tanto desarrollar resistencia (Meier *et al.*, 1994).

Las mutaciones en genes que codifican para proteínas ribosomales pueden también alterar la actividad de los aminoglicósidos. Destacan las mutaciones en

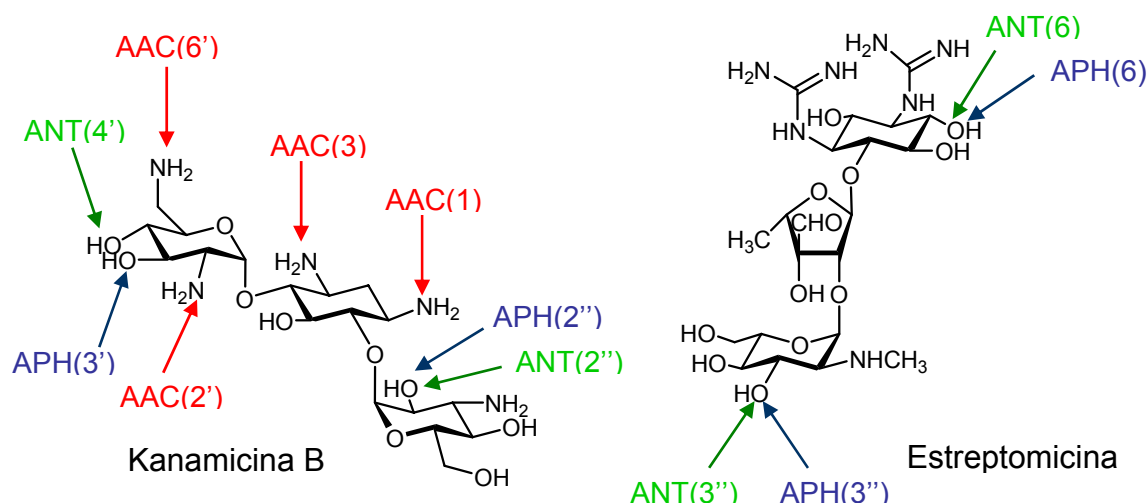
la proteína S12, que confiere resistencia a la estreptomicina en *M. tuberculosis* y en otras especies (Yamane *et al.*, 2005).

*c) Modificación enzimática del aminoglicósido.*

Es el mecanismo más importante de resistencia a aminoglicósidos (Shaw *et al.*, 1993; Hotta *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1997) ya que es el más comúnmente encontrado en muestras clínicas de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Vakulenko y Mobashery., 2003). El antibiótico aminoglicósido modificado covalentemente por el enzima posee menor afinidad por el sitio A del ribosoma, y por lo tanto no se llega a desencadenar la Fase Dependiente de Energía II, permitiendo a la bacteria sobrevivir en presencia del antibiótico (Llano-Sotelo *et al.*, 2002).

Muchos de los enzimas modificadores de antibióticos aminoglicósidos (EMAs) están codificados en plásmidos y transposones, y la transferencia génica horizontal por conjugación es un fenómeno que se da de forma muy habitual (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Vakulenko *et al.*, 2003; Zarrilli *et al.*, 2005). Este intercambio de plásmidos y la diseminación de transposones facilitan la adquisición rápida del fenotipo resistente no sólo dentro de una especie bacteriana, sino entre una gran variedad de ellas.

Existen tres familias de EMAs: las aminoglicósido *N*-acetiltransferasas (AACs), las aminoglicósido *O*-fosfotransferasas (APHs) y las aminoglicósido *O*-adeniltransferasas (ANTs) (Figura 1.12). Así mismo, se ha detectado en los últimos años la aparición de enzimas bifuncionales que combinan dos actividades, ampliando el espectro de resistencia. La reacción que catalizan los EMAs es normalmente regioselectiva, y el nivel de resistencia que confiere cada una de ellas difiere significativamente entre microorganismos y cepas, y depende de varios factores, como la cantidad de enzima producido, su eficacia catalítica y el tipo de aminoglicósido.



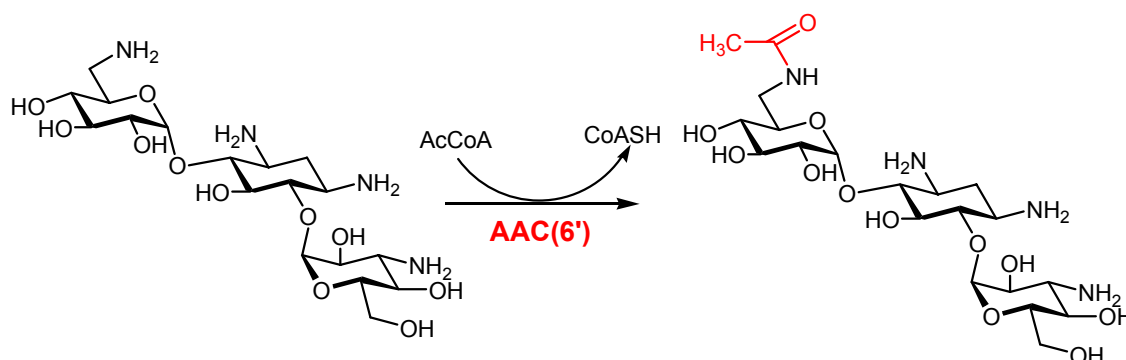
**Figura 1.12.** Sitios de modificación de la kanamicina B y la estreptomicina por varios enzimas modificadores de antibióticos aminoglicósidos. Las flechas indican el sitio exacto de cada modificación.

Cada una de estas familias se divide en clases según el sitio de modificación, el cual viene indicado entre paréntesis en la Figura 1.12. Además se subdividen en tipos, designado por números romanos, que especifican el patrón de resistencia que confieren. Por último, los enzimas de una misma clase y tipo que producen un mismo fenotipo pero están codificadas por genes diferentes, están designados con una letra en minúscula (Shaw *et al.*, 1993). Por ejemplo, los enzimas AAC(6')-I, AAC(6')-Ia, AAC(6')-Ib, AAC(6')-Ic, etc., son aminoglicósido *N*-acetiltransferasas que modifican el antibiótico en posición 6' y que producen el mismo fenotipo (inactivación de tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina y dibekacina) pero que están codificadas por genes diferentes.

#### c.1.) *N*-acetiltransferasas.

Es la familia más extensa de las tres, con aproximadamente 48 secuencias identificadas hasta la fecha que codifican para AACs y con cuatro enzimas cuyas estructuras tridimensionales han sido resueltas.

Estos enzimas catalizan la *N*-acetilación de un grupo amino presente en el aminoglicósido, utilizando acetil-CoA como donador del grupo acilo (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Reacción catalizada por las *N*-acetiltransferasas. La reacción que se muestra es la catalizada por la AAC(6') sobre la posición 6' de la kanamicina A.

En algunos casos, estos enzimas son capaces de acetilar un grupo hidroxilo del aminoglicósido. Hasta la fecha, en esta familia se han descrito enzimas que acetilan los grupos amino en posición 2' y 6' del anillo I (glucosamina) y enzimas que acetilan los grupos amino en posición 1 y 3 del anillo II (2-desoxiestreptamina).

- AACs que actúan sobre el anillo I del antibiótico aminoglicósido:

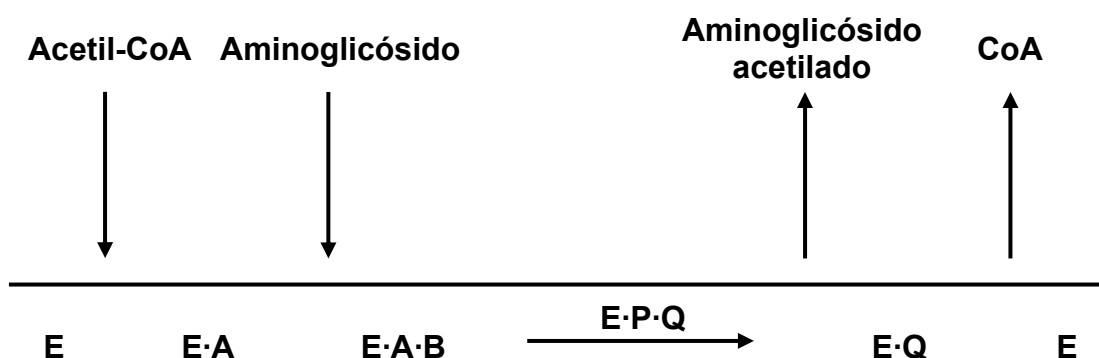
a) AAC(2').

Se han descrito cinco AACs que catalizan la *N*-acetilación del grupo amino en posición 2'. Todas ellas se encuentran codificadas en el cromosoma bacteriano.

La primera que se identificó fue la AAC(2')-Ia de *Providencia stuartii* (Rather *et al.*, 1993). En cepas nativas, la expresión del gen *aac(2')-Ia* es muy baja y no es suficiente como para conferir resistencia a antibióticos aminoglicósidos. Sin embargo, mutaciones en dicho gen dan lugar a niveles alterados de *O*-acetilación en el peptidoglicano, lo que sugiere que esta acetilación podría ser una función fisiológica del enzima (Payie *et al.*, 1995). Los otros miembros de la clase AAC(2') se han identificado en especies del género *Mycobacterium*, como *M. fortuitum*, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Los correspondientes enzimas poseen entre un 60-70% de identidad de secuencia entre ellas, y sólo un 30-40% de identidad con la AAC(2')-Ia de *P. stuartii*.

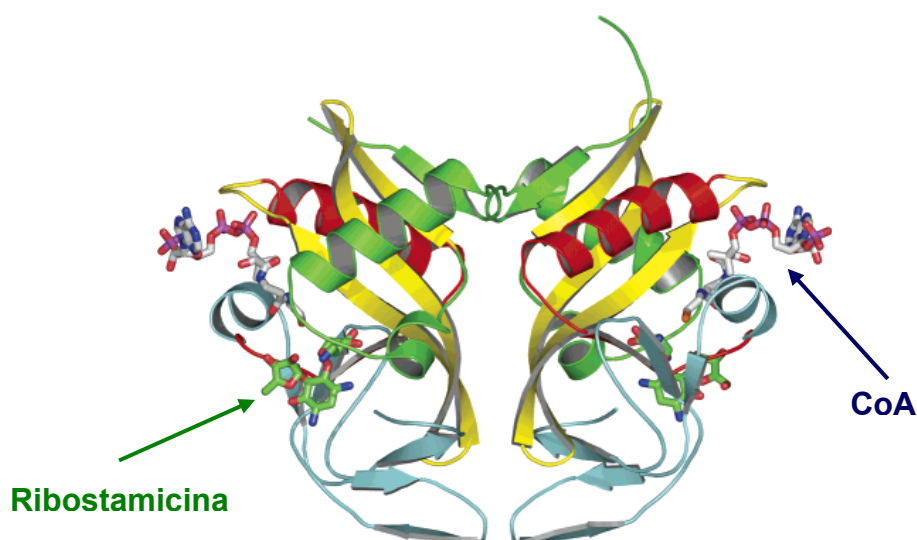
La AAC(2')-Ic de *M. tuberculosis* presenta una especificidad amplia de sustrato, e incluso se ha detectado actividad acetiltransferasa con sustratos

como la kanamicina A y la amikacina, que poseen un grupo hidroxilo en posición 2' (Hedge *et al.*, 2001). Estudios cinéticos con diferentes sustratos, sugieren un mecanismo cinético secuencial ordenado en el que el acetil-CoA se une primero al enzima, seguido del aminoglicósido (Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Esquema del mecanismo cinético secuencial ordenado de la AAC(2')-Ic de *M. tuberculosis*. La línea horizontal representa la reacción que sucede de izquierda a derecha. E=Enzima; A=Acetil-CoA; B=Aminoglicósido; P=Aminoglicósido acetilado; Q=CoA.

Recientemente se ha descrito la estructura tridimensional del enzima asociado a CoA y a tres aminoglicósidos diferentes: tobramicina (número de acceso del PDB: 1M4D) kanamicina A (número de acceso del PDB: 1M4I) y ribostamicina (número de acceso del PDB: 1M4G) (Vetting *et al.*, 2002) (Figura 1.15).



**Figura 1.15.** Estructura tridimensional de la AAC(2') de *M. tuberculosis* en complejo con CoA y ribostamicina. Número de acceso del PDB: 1M4G.

A pesar de que no tiene homología de secuencia con otras *N*-acetiltransferasas, el plegamiento del monómero es prácticamente idéntico al de la AAC(3) de *Serratia marcescens* y al de la AAC(6')-II de *Enterococcus faecium*.

b) AAC(6').

En los datos estructurales de aminoglicósidos unidos a la subunidad ribosomal 30S, se comprobó que el grupo amino en posición 6' juega un importante papel en la unión a la diana ribosomal y por lo tanto, en la actividad antibacteriana del aminoglicósido (Fourmy *et al.*, 1996; Fourmy *et al.*, 1998a; Carter *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). Así, no es sorprendente que este sustituyente sea la diana de acción de una de las clases más numerosas de EMAs, la AAC(6'), que incluye más de 25 miembros. El patrón de resistencia más común asociado a la producción de estas enzimas incluye la mayoría de aminoglicósidos usados en clínica. De entre todos los tipos, dos enzimas se han estudiado extensivamente: la AAC(6')-II de *Enterococcus faecium* y la AAC(6')-I de *Salmonella enterica*, ambas codificadas en el cromosoma bacteriano.

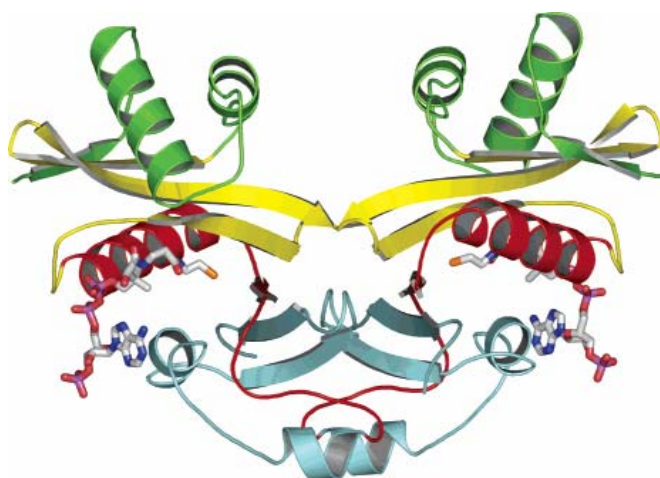
La AAC(6')-II de *E. faecium* posee una amplia especificidad de sustrato para donadores de grupo acilo y para aminoglicósidos que contengan un grupo amino en posición 6' (Wright y Ladak, 1997). Los estudios cinéticos y de inhibición indican que el enzima sigue un mecanismo cinético secuencial ordenado, en el que el acetil-CoA se une primero y el CoA es el último en ser liberado (Draker *et al.*, 2003) (Figura 1.16).





**Figura 1.16.** Esquema del mecanismo cinético secuencial ordenado de la AAC(6')-li de *E. faecium*. La línea horizontal representa la reacción que sucede de izquierda a derecha. E=Enzima; A=Acetil-CoA; B=Aminoglicósido; P=Aminoglicósido acetilado; Q=CoA.

La estructura de la AAC(6')-li se resolvió en presencia del sustrato acetil-CoA (número de acceso del PDB: 1B87) (Wybenga-Groot *et al.*, 1999) y del producto CoA (número de acceso del PDB: 1N71) (Burk *et al.*, 2003), mostrando que el enzima era dimérico (Figura 1.17).



**Figura 1.17.** Estructura de la AAC(6')-li de *E. faecium* en complejo con CoA. Número de acceso del PDB: 1N71.

La AAC(6')-ly de *S. enterica* es un enzima dimérico y posee una especificidad amplia por los aminoglicósidos que tienen un grupo amino en 6', al igual que la AAC(6')-li de *E. faecium*, pero en contraste presenta una preferencia alta por el acetil-CoA como donador del grupo acilo. Los estudios cinéticos muestran que el enzima sigue un mecanismo cinético secuencial al azar (Magnet *et al.*, 2001), y se ha resuelto su estructura tridimensional en

complejo con ribostamicina y CoA (número de acceso del PDB: 1S3Z) (Vetting *et al.*, 2004).

- AACs que actúan sobre el anillo II del antibiótico aminoglicósido:

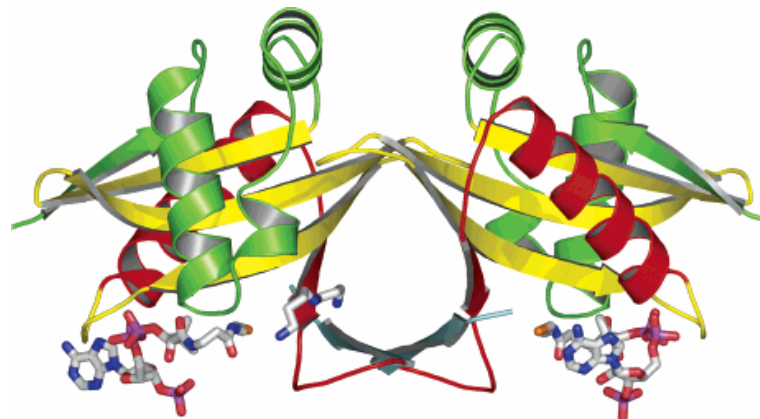
a) AAC(1).

Se han identificado dos enzimas AAC(1) distintas en *E. coli* y en cepas de *Actinomyces*, pero su importancia es menor, ya que el enzima de *E. coli* no modifica los aminoglicósidos usados en clínica, y la otra, que posee un amplio rango de especificidad por el sustrato, no se encuentra en patógenos humanos (Lovering *et al.*, 1987; Sunada *et al.*, 1999).

b) AAC(3).

Es una de las clases de *N*-acetiltransferasas más abundante e incluye cuatro tipos mayoritarios según el patrón de resistencia que confieren.

El primer enzima modificador de antibióticos aminoglicósidos que se purificó fue la gentamicina *N*-acetiltransferasa de *E. coli*, que se encuentra codificada en un plásmido (Williams y Northrop, 1976). Por otro lado, la estructura tridimensional de la AAC(3)-I de *Serratia marcescens* fue la primera que se determinó de la familia de las *N*-acetiltransferasas (número de acceso del PDB: 1BO4) (Wolf *et al.*, 1998) (Figura 1.18). El complejo estructural formado por el enzima y el CoA permitió determinar las interacciones entre ambos, además de comprobar que el enzima cristalizaba en forma de dímero.

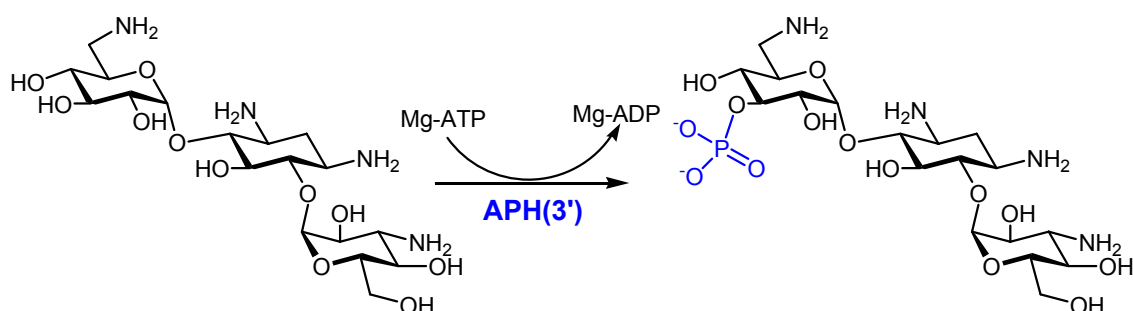


**Figura 1.18.** Estructura de la AAC(3) de *S. marcescens* en complejo con CoA. Número de acceso del PDB: 1BO4.

c.2.) O-fosfotransferasas.

Las aminoglicósido O-fosfotransferasas constituyen la segunda familia más abundante de enzimas involucrados en la resistencia a antibióticos aminoglicósidos y son relevantes en la resistencia en clínica en especies de los géneros *Enterococcus* y *Staphylococcus*.

Las APHs catalizan la transferencia del grupo  $\gamma$ -fosfato del ATP a uno de los grupos hidroxilo presentes en el aminoglicósido (Figura 1.19).



**Figura 1.19.** Reacción catalizada por las O-fosfotransferasas. La reacción que se muestra es la que lleva a cabo la APH(3') sobre la posición 3' de la kanamicina A.

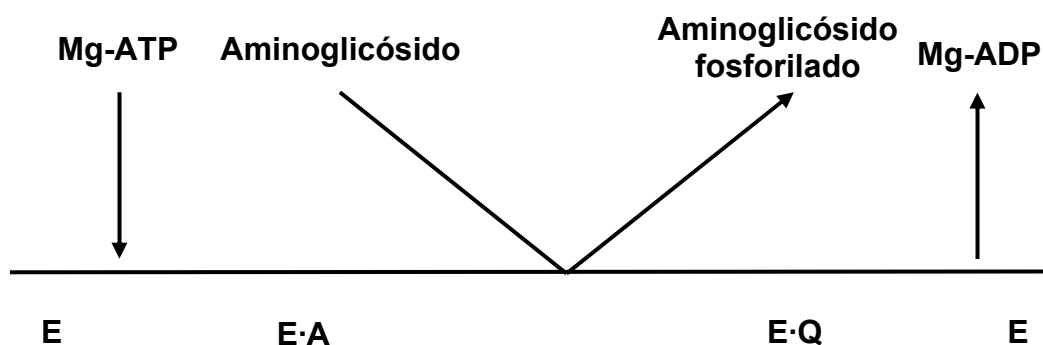
Existen siete clases de APHs según la posición del grupo hidroxilo que modifican (Shaw *et al.*, 1993). Todas las APHs descritas hasta la fecha presentan un elevado grado de identidad de secuencia (20-40%), que en la región C-terminal llega a alcanzar el 70% (Brenner, 1987).

Hasta la fecha, se han descrito dos estructuras tridimensionales de APHs: la APH(3')-IIa (número de acceso del PDB: 1ND4) (Nurizzo *et al.*, 2003) y la APH(3')-IIIa —la cual detallaremos a continuación— (Burk *et al.*, 2001; Fong y Berghuis, 2002).

La clase de APHs más abundante es aquella que modifica la kanamicina y compuestos que presentan un grupo hidroxilo en posición 3', por lo que compuestos que no tienen esta funcionalidad, como la gentamicina y la tobramicina, no son sustratos para estas enzimas (Wright y Thompson, 1999). Sin embargo, se ha observado que en aquellos aminoglicósidos sin sustituyente hidroxilo en 3', como la lividomicina A, la fosforilación se podía dar en el grupo hidroxilo en 5'' del anillo de ribosa, aunque esta actividad no se da en todas las APH(3') (Trieu-Cout y Courvalin, 1983). Los genes que codifican

para estos enzimas son muy utilizados en biología molecular como marcadores de selección en técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, el gen que codifica para la APH(3')-IIa se utiliza en vectores comerciales como marcador de selección para neomicina o kanamicina.

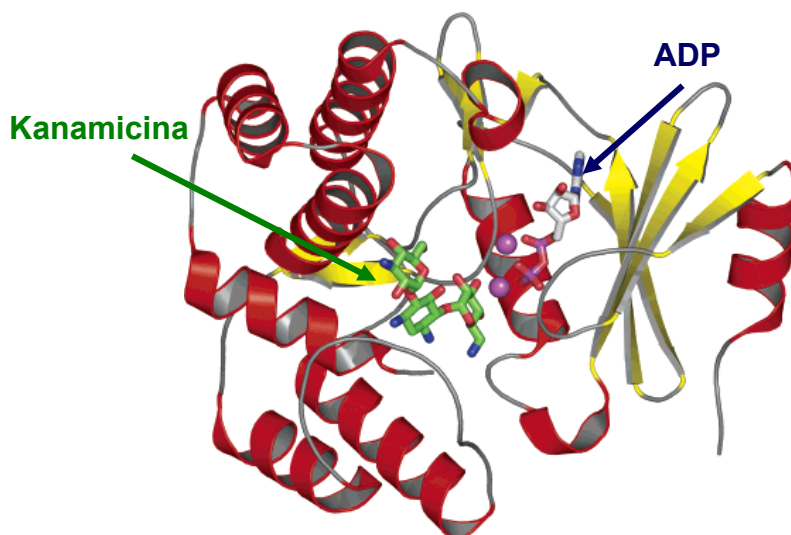
La gran mayoría de estudios estructurales y bioquímicos realizados se han centrado en la APH(3')-IIIa de *Enterococcus faecalis*. Este enzima es capaz de catalizar la fosforilación de un amplio rango de aminoglicósidos (McKay *et al.*, 1994). Además, el enzima actúa sobre aquellos aminoglicósidos 4,5-disustituidos que contienen grupos hidroxilo en posiciones 3' y 5'', llevando a cabo una bis-fosforilación del compuesto (Thompson *et al.*, 1996). Los estudios cinéticos muestran que el enzima sigue un mecanismo secuencial ordenado, en el que el ATP se une primero, seguido del aminoglicósido (McKay y Wright, 1995) (Figura 1.20).



**Figura 1.20.** Esquema del mecanismo cinético Theorell-Chance de la APH(3')-IIIa de *E. faecalis*. La línea horizontal representa la reacción que sucede de izquierda a derecha. E=Enzima; A=Mg-ATP; Q=Mg-ADP.

En este mismo trabajo, estudios con análogos de sustrato no hidrolizables y de inhibición por sustrato demostraron que el mecanismo es de tipo Theorell-Chance, que es un caso especial de mecanismo secuencial ordenado en el que el complejo ternario ( $E \cdot \text{ATP} \cdot \text{kan} \leftrightarrow E \cdot \text{kan-fos} \cdot \text{ADP}$ ) es cinéticamente insignificante y no contribuye a la tasa de reacción (Rudolph, 1979). En este tipo de mecanismo se produce una rápida liberación de kanamicina-fosfato seguida de una liberación lenta de Mg-ADP que es la etapa limitante. La existencia de complejo ternario se estableció por estudios de velocidades iniciales.

En 2001 se resolvió la estructura del enzima sin ningún sustrato (número de acceso del PDB: 1J7I) y en complejo con el análogo de ATP no hidrolizable AMPPNP (adenosina (5'- $\beta,\gamma$ -imino-trifosfato)) (número de acceso del PDB: 1J7U), así como en complejo con ADP (número de acceso del PDB: 1J7L) (Burk *et al.*, 2001). Al año siguiente se obtuvo la estructura del enzima acomplejado con Mg-ADP y con kanamicina A o neomicina B (números de acceso del PDB: 1L8T y 2B0Q, respectivamente) (Fong y Berghuis, 2002) (Figura 1.21). De estos estudios, se pudo comprobar que ambos aminoglicósidos interaccionaban mayoritariamente con residuos del extremo C-terminal, y que estas interacciones eran de tipo electrostático.

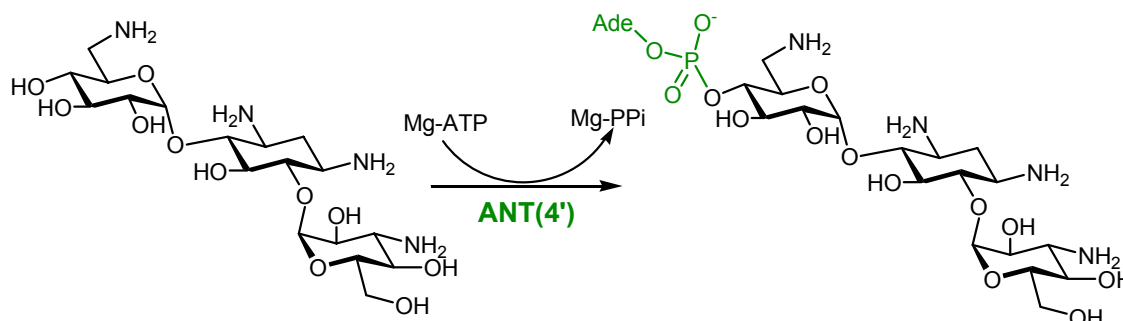


**Figura 1.21.** Estructura de la APH(3')-IIIa de *E. faecalis* en complejo con magnesio-ADP y kanamicina. Los dos átomos de magnesio se muestran como esferas púrpuras. Número de acceso del PDB: 1L87.

### c.3.) O-adeniltransferasas.

La familia de las ANTs es la menos numerosa de todas, con sólo 10 enzimas descritos hasta la fecha y dos con estructura tridimensional resuelta. Incluye ejemplos de enzimas codificados en el cromosoma bacteriano y en plásmidos (Magnet y Blanchard, 2005). En organismos Gram-negativos, los genes que codifican para ANT(2'') y ANT(3'') se encuentran localizados únicamente en elementos génicos móviles, mientras que en Gram-positivos los genes que codifican para ANT(4'), ANT(6) y ANT(9) pueden encontrarse

también en plásmidos (Shaw *et al.*, 1993). Estos enzimas catalizan la reacción entre Mg-ATP y un aminoglicósido para formar el AMP-aminoglicósido y el quelato magnésico del pirofosfato inorgánico (Figura 1.22).

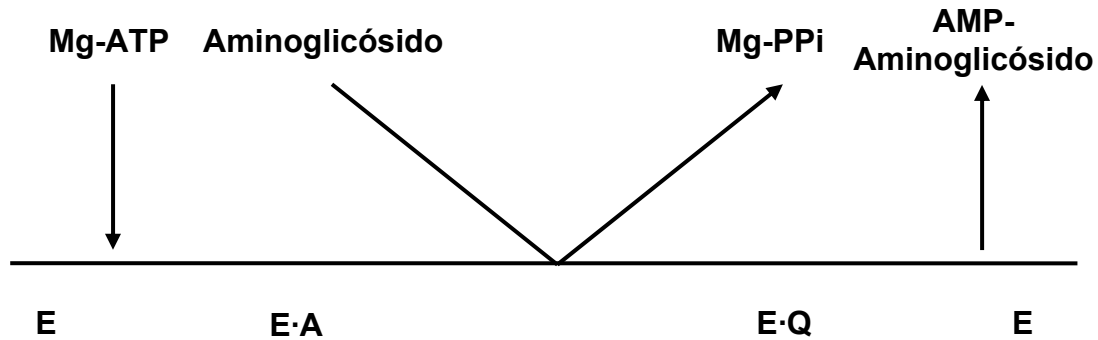


**Figura 1.22.** Reacción catalizada por las O-adeniltransferasas. La reacción que se muestra es la que lleva a cabo la ANT(4') sobre la posición 4' de la kanamicina A. (Ade=Grupo adenilo).

La ANT(2'') confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, dibekacina, sisomicina y kanamicina (Cameron *et al.*, 1986), mientras que la ANT(4') confiere a tobramicina, amikacina, isepamicina, kanamicina y otros aminoglicósidos con grupo hidroxilo en 4' y 4'' (Jacoby *et al.*, 1990). La ANT(3'') confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina (Hollingshead y Vapnek, 1985), mientras que la ANT(6) y la ANT(9) confieren resistencia a estreptomicina y espectinomicina respectivamente (Murphy, 1985; Ounissi *et al.*, 1990). Desde una perspectiva clínica, las reacciones catalizadas por la ANT(2'')-I y la ANT(4') son las más significativas y son las que más se han estudiado hasta la fecha.

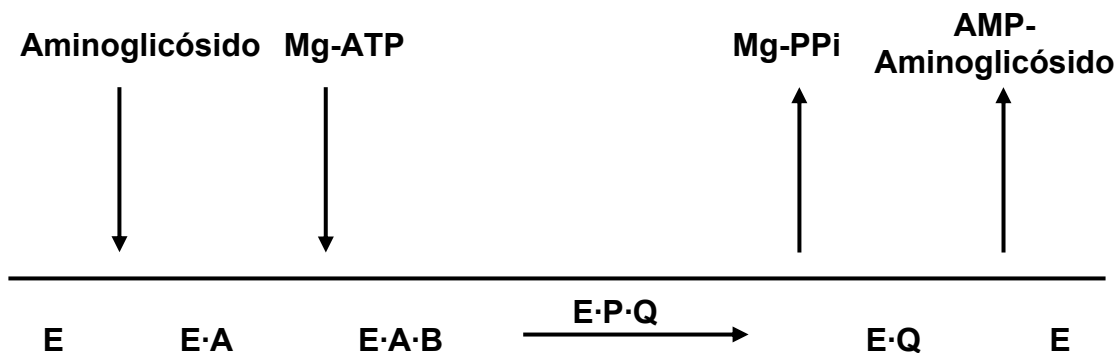
Los estudios mecanísticos de la ANT(2'')-I de *Klebsiella pneumoniae* fueron llevados a cabo por los grupos de Lombardini y Northrop (Lombardini y Cheng-Chu, 1980; Van Pelt y Northrop, 1984; Gates y Northrop, 1988a; Gates y Northrop, 1988b; Gates y Northrop, 1988c). Ambos grupos encontraron que el enzima seguía un mecanismo cinético secuencial ordenado, en el que los dos sustratos debían de estar presentes para que se diese la catálisis, y Lombardini y colaboradores sugirieron un mecanismo ordenado en el que el Mg-ATP se unía antes que el aminoglicósido. Unos años más tarde Northrop y colaboradores encontraron el mismo tipo de mecanismo ordenado, y hallaron que la liberación del pirofosfato inorgánico se producía antes que la del AMP-

aminoglicósido, que es la etapa limitante (Figura 1.23). La lenta liberación de producto adenilado hace que este mecanismo cinético sea de tipo Theorell-Chance.



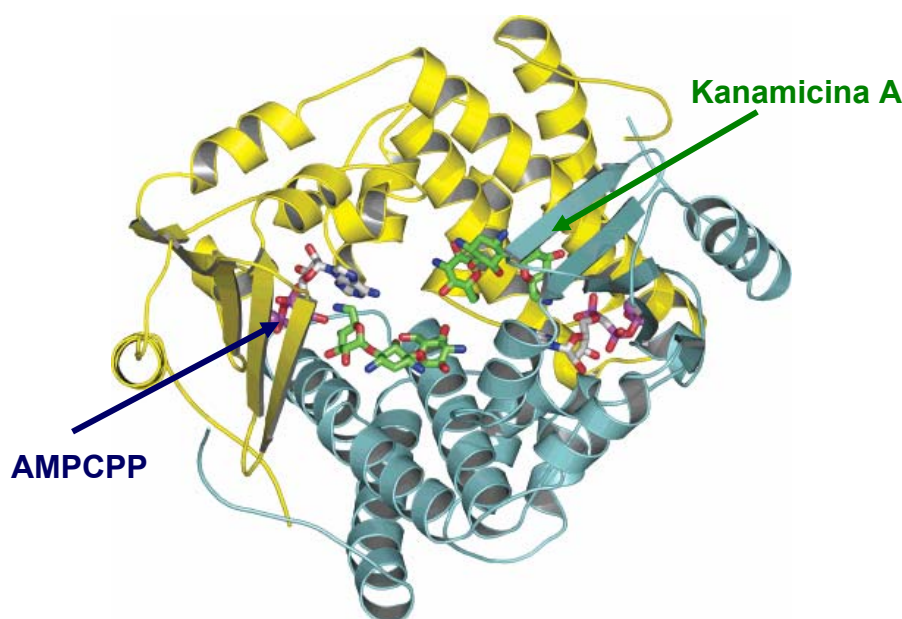
**Figura 1.23.** Esquema del mecanismo cinético Theorell-Chance de la ANT(2'')-I de *K. pneumoniae*. La línea horizontal representa la reacción que sucede de izquierda a derecha. E=Enzima; A=Mg-ATP; Q=AMP-Aminoglicósido.

La ANT(4') de *Staphylococcus aureus* se identificó por primera vez en clínica en una cepa resistente a kanamicina y gentamicina (Le Goffic *et al.*, 1976), y posteriormente se comprobó que tenía actividad con un gran número de aminoglicósidos que presentaban sustituyentes hidroxilo en 4' o en 4'' (Davies y Smith, 1978). El mecanismo cinético que sigue este enzima es de tipo secuencial ordenado, en el que el aminoglicósido se une primero, seguido del Mg-ATP. A continuación, el pirofosfato abandona primero el centro activo del enzima, y tras él, el AMP-aminoglicósido (Chen-Goodspeed *et al.*, 1999) (Figura 1.24).



**Figura 1.24.** Esquema del mecanismo cinético secuencial ordenado de la ANT(4') de *S. aureus*. La línea horizontal representa la reacción que sucede de izquierda a derecha. E=Enzima; A=Aminoglicósido; B=Mg-ATP; P=Mg-PPi; Q=AMP-Aminoglicósido.

La ANT(4') fue la primera ANT cuya estructura se resolvió por difracción de rayos-X (número de acceso del PDB: 1KNY) (Sakon *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 1995) (Figura 1.25). La estructura revela que la ANT(4') es un homodímero con los dos sitios de unión del ATP y el aminoglicósido en la interfase de la dimerización. Cada uno de los monómeros posee un dominio N-terminal y otro C-terminal del mismo tamaño y, en general, los residuos del dominio N-terminal interaccionan con el nucleótido, mientras que los del C-terminal lo hacen con el aminoglicósido. El centro de reconocimiento del aminoglicósido está localizado en una zona caracterizada por un fuerte potencial electrostático negativo y se ha postulado que es el ácido glutámico 145 el que actúa como catalizador ácido-base en la reacción de adenilación. Su función sería la de sustraer el protón del hidroxilo en 4', como paso previo al ataque nucleófilo sobre el fosfato en posición  $\alpha$  del nucleótido (Chen-Goodspeed *et al.*, 1999).

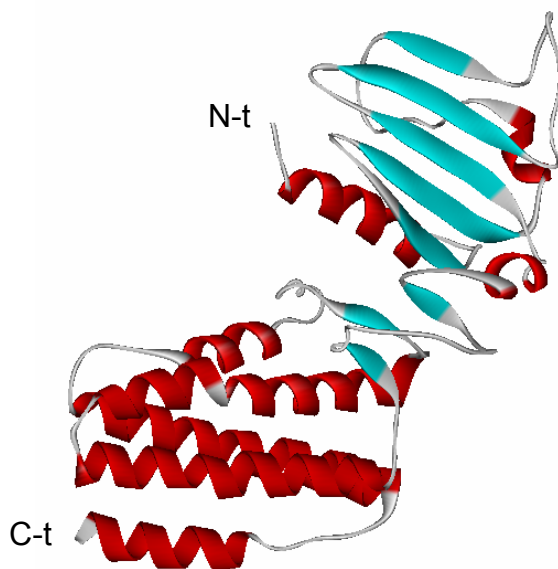


**Figura 1.25.** Estructura de la ANT(4') de *S. aureus* en complejo con AMPCPP ( $\alpha,\beta$ -metilen derivado del ATP no hidrolizable) y kanamicina A. Número de acceso del PDB: 1KNY.

Como se ha comentado anteriormente, la estreptomicina es un aminoglicósido único desde el punto de vista estructural y por tanto presenta también características funcionales diferentes al resto de antibióticos aminoglicósidos. De esta forma, a pesar de que los primeros casos de resistencia a estreptomicina datan de 1956 (Umezawa *et al.*, 1967), todavía se



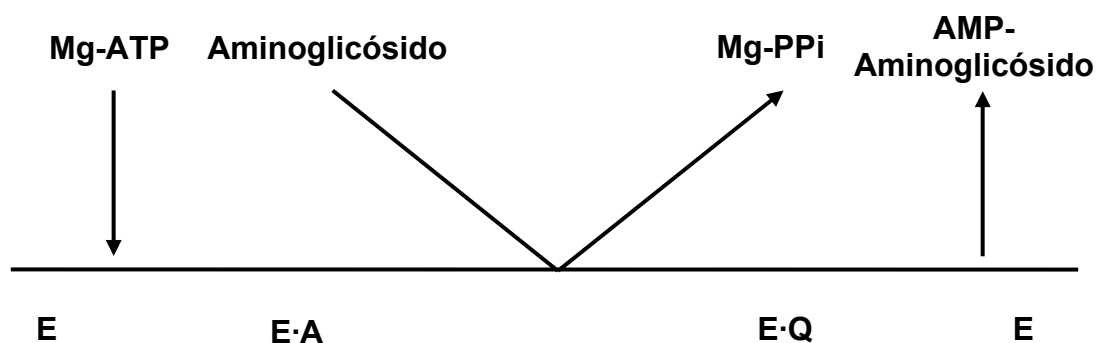
sigue usando en clínica para tratar diversas enfermedades como la tuberculosis (Silva y Carvalho, 2007). A pesar del interés intrínseco de este antibiótico y de que el enzima ANT(6) es una de las principales causas de resistencia a éste, hasta el momento de iniciar el presente trabajo eran muy escasos los datos referidos a dicho enzima. Cabe destacar los trabajos realizados por el grupo de Kono y colaboradores que identificaron el gen *aadK* que codifica para el enzima ANT(6) en *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (O'hara *et al.*, 1988; Ohmiya *et al.*, 1989). Aunque estos autores no han propuesto el mecanismo de acción de este enzima, sí han descrito la velocidad máxima y  $K_M$  para la estreptomicina, siendo  $4 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg}$  de proteína y  $0.08 \text{ mM}$ , respectivamente (Kono *et al.*, 1987). Recientemente se ha depositado en el Protein Data Bank una determinación estructural de la ANT(6) de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* con una resolución de  $2.65 \text{ \AA}$  (número de acceso del PDB: 2PBE) (Tyagi, R., Eswaramoorthy, S., Burley, S.K., Swaminathan, S., New York Structural GenomiX Research Consortium, 2007) (Figura 1.26). En esta estructura, la ANT(6) se presenta en forma monomérica a diferencia de la ANT(4') que es un homodímero.



**Figura 1.26.** Estructura tridimensional de la ANT(6) de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* a una resolución de  $2.65 \text{ \AA}$ . Número de acceso del PDB: 2PBE. N-t= Extremo N-terminal, C-t= Extremo C-terminal.

Más recientemente, el grupo de Deb y colaboradores han descrito una ANT(6) en la bacteria *Corynebacterium acetoacidophilum*. Este enzima ha sido expresado en *E. coli* (Jana *et al.*, 2005; Jana *et al.*, 2006) y se ha descrito el

mecanismo de acción del enzima recombinante. El mecanismo general es, como en el caso de otras adeniltransferasas, de tipo secuencial ordenado y los autores postulan un mecanismo de tipo Theorell-Chance en base al patrón de inhibiciones halladas (Jana y Deb, 2005) (Figura 1.27).



**Figura 1.27.** Esquema del mecanismo cinético Theorell-Chance de la ANT(6) de *C. acetoacidophilum*. La línea horizontal representa la reacción que sucede de izquierda a derecha. E=Enzima; A=Mg-ATP; Q=AMP-Aminoglicósido.

Nuestro grupo de investigación está trabajando desde hace años en la obtención y caracterización de enzimas de resistencia a antibióticos aminoglicósidos, y en particular nos hemos centrado en las adeniltransferasas ANT(6) y ANT(4') (Asensio *et al.*, 2005; Corzana *et al.*, 2005; Bastida *et al.*, 2006; Corzana *et al.*, 2007; Latorre *et al.*, 2007). En estos trabajos se persigue un doble objetivo: i) por una parte obtener un conocimiento lo más detallado posible de la estructura y mecanismo de acción de estos enzimas y de los factores que gobiernan la interacción con sus sustratos y ii) diseñar nuevas estrategias que permitan combatir el problema de la resistencia bien mediante el diseño de nuevos antibióticos que escapen a la acción de los EMAs o mediante la obtención de inhibidores de estos enzimas que administrados conjuntamente con el antibiótico permitan la recuperación de la actividad de éste último; este aspecto será comentado con mayor detalle más adelante. En este contexto es en el que se ha desarrollado el trabajo de la presente Tesis Doctoral.

c.4.) Enzimas bifuncionales.

Hasta el momento se han descrito cuatro enzimas bifuncionales que confieren resistencia a antibióticos aminoglicósidos. Es importante resaltar que los enzimas bifuncionales son relativamente inusuales en bacterias, en contraste con su presencia en las células eucariotas. Se ha propuesto que el origen de estos enzimas sea la fusión génica, con el fin de ampliar el espectro de resistencia a aminoglicósidos. Esto ilustra la gran capacidad de las cepas bacterianas de adaptarse rápidamente a la presión selectiva del entorno.

En 1986 se descubrió el primer enzima bifuncional en una cepa de *Enterococcus faecalis*, la AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia (Ferretti *et al.*, 1986) y un año después se encontró en *Staphylococcus aureus* (Rouch *et al.*, 1987). Más tarde se comprobó que este enzima se encontraba en el 25-40% de las cepas de *S. aureus* (Culebras y Martínez, 1999). El enzima es monomérico en disolución y es capaz de catalizar la N- y la O-acetilación con una amplia especificidad de sustrato (Daigle *et al.*, 1999).

Recientemente se han aislado tres enzimas bifuncionales más: la ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId de *Serratia marcescens* (Centron y Roy, 2002), la AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' (Dubois *et al.*, 2002) y la AAC(6')-30/AAC(6')Ib' (Mendes *et al.*, 2004), ambas de *Pseudomonas aeruginosa*.

La ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId de *S. marcescens* ha sido objeto de un extenso estudio en el que se determina que el dominio con actividad adeniltransferasa tiene una especificidad alta por el aminoglicósido, adenilando estreptomicina y espectinomicina, mientras que el dominio con actividad acetiltransferasa presenta una especificidad por el aminoglicósido más amplia (Kim *et al.*, 2006). El mecanismo cinético resultó ser secuencial ordenado de tipo Theorell-Chance para el dominio adeniltransferasa, uniéndose el Mg-ATP al centro activo antes que el aminoglicósido y siendo el aminoglicósido adenilado el último producto en abandonar el enzima, y de tipo secuencial ordenado para el dominio acetiltransferasa, en el que el aminoglicósido se une primero al enzima y el aminoglicósido adenilado es el último en liberarse del centro activo.

En el año 2007 se llevó a cabo la caracterización cinética del enzima bifuncional AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' de *P. aeruginosa* (Kim *et al.*, 2007). En este estudio se encontró que ambos dominios seguían un mecanismo cinético de

tipo secuencial ordenado en el que la acetil-CoA se une primero al centro activo, seguido del aminoglicósido, y el CoA es el último en liberarse.

Hasta la fecha, no existe ninguna determinación estructural de los enzimas bifuncionales descritos.

- ***Estrategias para recuperar el uso de los antibióticos aminoglicósidos.***

Todo antibiótico que se introduce en clínica tiene una vida útil limitada, ya que su uso da lugar a la selección de aquellas bacterias que poseen algún tipo de mecanismo de resistencia. La resistencia se desarrolla a todas las clases de antibióticos, ya sean naturales o sintéticos, en el curso de un año a una década desde su primer uso clínico (Walsh, 2003). Debido a que las cepas resistentes a un determinado antibiótico terminarán por emerger en algún momento, el conocimiento del mecanismo de resistencia es fundamental a la hora de intentar desarrollar nuevos compuestos terapéuticos. Tal como hemos mencionado anteriormente, la resistencia a antibióticos aminoglicósidos se debe principalmente a la desactivación enzimática de éste, por lo que un conocimiento detallado de la estructura tridimensional, mecanismo bioquímico de resistencia, especificidad de sustrato y eficacia catalítica de los diferentes enzimas modificadores de antibióticos aminoglicósidos será de gran utilidad para conseguir revertir el problema de la resistencia (Jana y Deb, 2006). Con este fin, dos aproximaciones son las que están siendo desarrolladas actualmente (Smith y Baker, 2002):

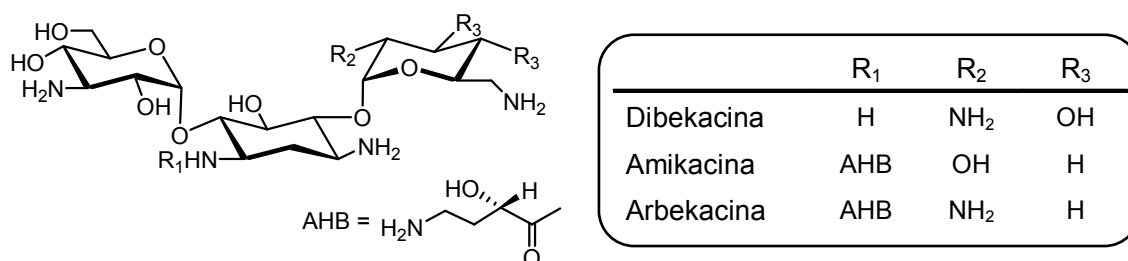
- a) *Diseño de nuevos antibióticos aminoglicósidos que escapen a la acción de los EMAs.*
- b) *Diseño de inhibidores enzimáticos.*

a) *Diseño de nuevos antibióticos aminoglicósidos que escapen a la acción de los EMAs.*

En base a los mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos, Umezawa y colaboradores iniciaron la síntesis de derivados

que no fuesen susceptibles a la modificación enzimática e inhibiesen el crecimiento de las cepas bacterianas resistentes. El primer agente sintetizado fue la 6',3''-di-*N*-metilkanamicina, que inhibía el crecimiento de aquellas cepas de *E. coli* que expresaban la AAC(6') pero que mostraba una acción antibiótica más débil que la kanamicina frente a cepas resistentes a dicho antibiótico (Maeda *et al.*, 1967).

La siguiente en ser sintetizada fue la 3'-desoxikanamicina B que mostró una excelente actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo aquellas que expresaban la APH(3') (Umezawa *et al.*, 1971a). Como consecuencia de este éxito, se preparó la 3',4'-didesoxikanamicina B o dibekacina (Figura 1.28), siendo el primer aminoglicósido semisintético diseñado racionalmente en base a la fosforilación en posición 3' de la kanamicina (Umezawa *et al.*, 1971b).



**Figura 1.28.** Estructura química de aminoglicósidos semisintéticos derivados de la kanamicina A. AHB= 4-amino-2-hidroxibutirilo.

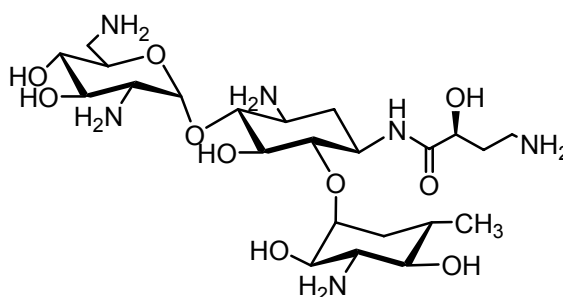
Este compuesto mostraba una potente actividad frente a bacterias Gram-negativas y bacterias resistentes de los géneros *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, ya que al no poseer los grupos hidroxilos en posición 3' y 4' no era susceptible de modificación por parte de los enzimas APH(3') y ANT(4'). Su uso terapéutico comenzó en Japón en 1975 y continúa hasta el día de hoy. Sin embargo, este compuesto puede ser desactivado por la ANT(2'') (Schmidt *et al.*, 1988), la APH(2'') que forma parte del enzima bifuncional AAC(6')/APH(2'') (Daigle *et al.*, 1999) y la AAC(6') (Wright, 1999).

Otra aproximación a la síntesis de aminoglicósidos resistentes a la acción de bacterias es la acilación ó alquilación del grupo amino en posición 1 en aminoglicósidos que contienen 2-desoxiestreptamina. Kawaguchi y colaboradores (1972) sintetizaron por primera vez la amikacina (Figura 1.28) a

través de la 1-*N*-acilación de la kanamicina con un grupo AHB (4-amino-2-hidroxibutirilo). Este compuesto inhibía el crecimiento de cepas que expresaban APH(3')-I y ANT(2') y lleva en uso terapéutico desde 1977, aunque unos años más tarde se comprobó que era sustrato de acetiltransferasas (Phillips y Shannon, 1984).

La posterior modificación de la dibekacina con la acilación de la posición N-1 con un grupo AHB, dio lugar a la arbekacina (Figura 1.28), que posee actividad antibiótica frente a bacterias Gram-negativas, incluida *Pseudomonas*, y bacterias del género *Staphylococcus* (Kondo *et al.*, 1973). En 1984, Ubutaka y colaboradores, demostraron que la arbekacina no era susceptible a modificación por parte de los enzimas APH(3') y ANT(4') presentes en cepas multirresistentes de *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Ubutaka *et al.*, 1984). La arbekacina se aprobó para su uso en terapia en 1990 en Japón y aún se utiliza extensamente (Kondo y Hotta, 1999).

Utilizando esta misma estrategia, Chang y colaboradores han sintetizado recientemente una serie de análogos de kanamicina y neomicina con un grupo AHB en posición N-1 (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). El compuesto más potente resultó ser un derivado de la kanamicina B, llamado JLN027 (Figura 1.29), que posee una actividad incluso mejor que la amikacina que se usa en clínica, frente a cepas resistentes que poseen actividad APH(3').

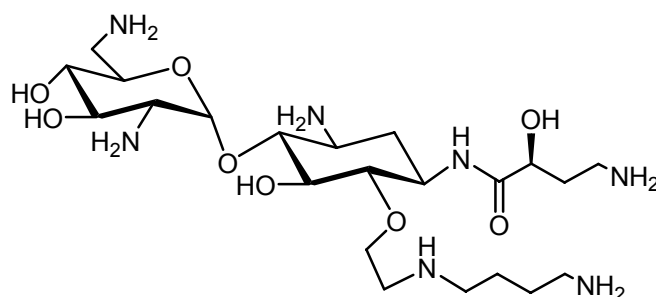


**Figura 1.29.** Compuesto JLN027 descrito por Chang y colaboradores.

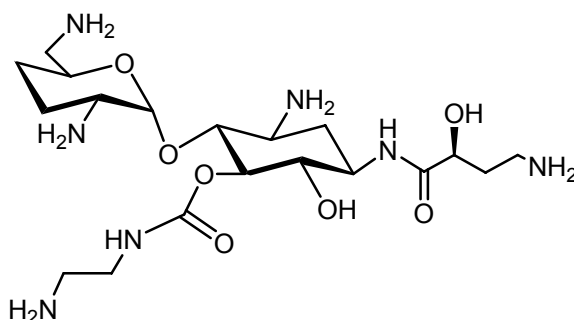
Otro ejemplo de compuesto semisintético, es un derivado de la neamina sintetizado por Mobashery y colaboradores (Haddad *et al.*, 2002). Aunque la mayoría de los aminoglicósidos naturales y semisintéticos contienen al menos tres anillos, este compuesto consiste en un pseudo-disacárido que está sustituido en la posición N-1 por un grupo AHB y en O-6 por una diamina

alifática (Figura 1.30a). Resultó ser altamente activo frente a varias cepas bacterianas patógenas, como *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Otro derivado de la neamina, un pseudo-disacárido que no posee los grupos hidroxilo en posición 3' y 4' y que por lo tanto no es susceptible de modificación por parte de los enzimas ANT(4') y APH(3'), ha sido sintetizado por el grupo de Ikeda y colaboradores (Figura 1.30b) (Minowa *et al.*, 2006). Este compuesto tiene una actividad excelente frente a cepas de *S. aureus* que expresan el enzima AAC(6')/APH(2'') y frente a cepas de *P. aeruginosa* que expresan los enzimas AAC(6') y AAC(3).

a)

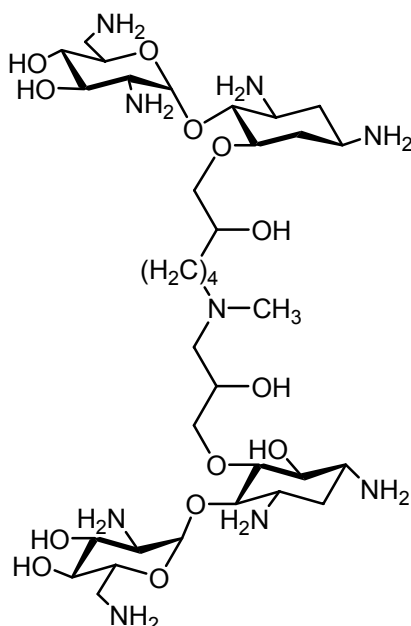


b)



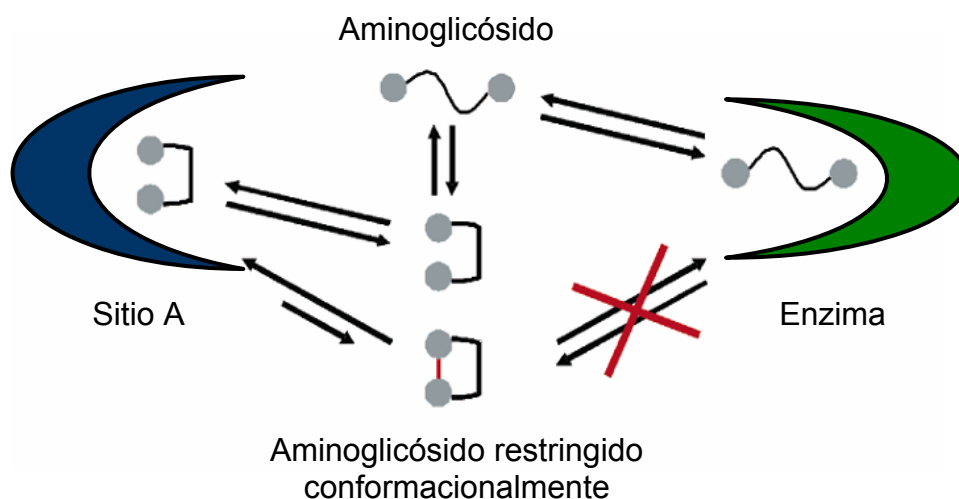
**Figura 1.30.** Derivados semisintéticos de neamina. a) Compuesto descrito por Mobashery y colaboradores. b) Compuesto descrito por Ikeda y colaboradores.

En un estudio reciente, se ha intentado sintetizar compuestos que tengan una afinidad alta por el sitio A ribosomal y que sean escasamente reconocidos por los enzimas modificadores. Un ejemplo de esta aproximación es la síntesis de dímeros de bis-neamina por Wright y colaboradores (Figura 1.31) (Sucheck *et al.*, 2000). Este tipo de compuestos se unen al sitio A del ARNr con afinidad alta, poseen actividad antibiótica y son un mal sustrato para los enzimas AAC(6') y AAC(6')/APH(2'').



**Figura 1.31.** Dímero de bis-neamina descrito por Wright y colaboradores.

Otra estrategia para el diseño de antibióticos que escapen de la acción de los EMAs es la desarrollada por Asensio y colaboradores y que se basa en que la conformación adoptada por el aminoglicósido al unirse al sitio A del ribosoma es diferente de la que presenta al unirse al enzima modificador (Figura 1.32).

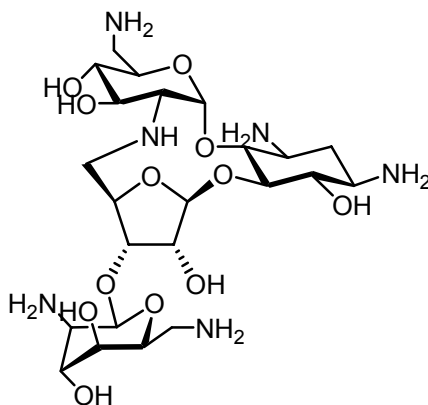


**Figura 1.32.** Esquema de la estrategia basada en la conformación del aminoglicósido propuesta por el grupo de Asensio y colaboradores. Modificado de Bastida *et al.*, 2006.

De esta manera se podrían sintetizar compuestos conformacionalmente restringidos que mantuvieran la conformación que presentan unidos a su diana biológica, pero que fuesen incapaces de ser reconocidos por el enzima.



Algunos de estos compuestos (Figura 1.33) exhibieron una buena actividad antibiótica *in vitro* frente a cepas que expresaban los enzimas ANT(4') y AAC(2'), así como una actividad antibiótica *in vivo* mejorada respecto al antibiótico neomicina B en cepas que expresaban la ANT(4') (Bastida *et al.*, 2006).



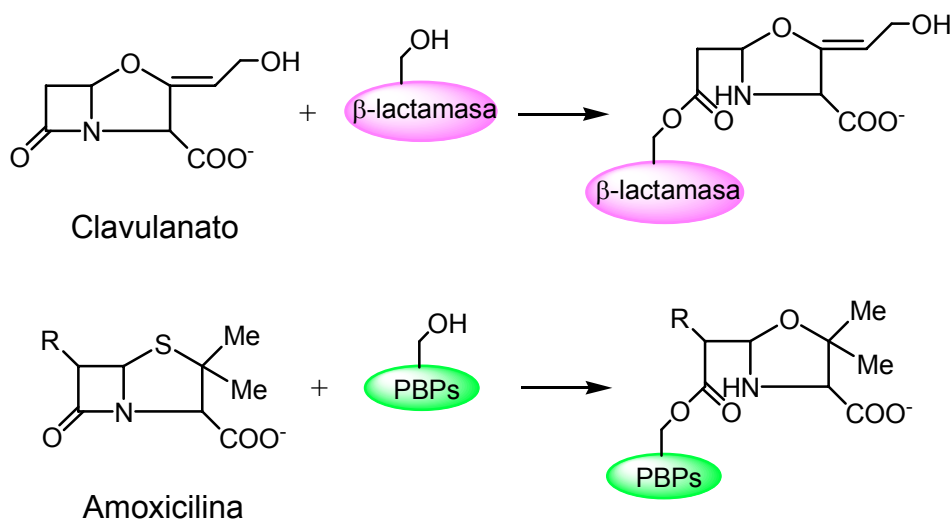
**Figura 1.33.** Estructura química de uno de los derivados de neomicina B restringido conformacionalmente.

En la actualidad, existe un gran potencial en el desarrollo de nuevos antibióticos aminoglicósidos que escapen a la acción de los EMAs debido a la creciente cantidad de información en cuanto a estructura tridimensional, mecanismo bioquímico de resistencia y especificidad de sustrato de los enzimas que inactivan dichos antibióticos.

#### *b) Diseño de inhibidores enzimáticos.*

La inhibición de los mecanismos de resistencia podría hacer resurgir el uso de antibióticos que se han convertido en menos eficaces debido a la aparición y diseminación de dichos mecanismos (Taylor *et al.*, 2002). Los compuestos que restauran la sensibilidad de las cepas resistentes al antibiótico son de una gran ayuda para lograr una terapia efectiva, además de tener un impacto significativo en el coste del tratamiento (Tan *et al.*, 2000). Esta estrategia se ha utilizado con éxito en el empleo de un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas en combinación con un antibiótico  $\beta$ -lactámico (Leigh *et al.*, 1981; Knowles, 1985), en lo que se ha venido a llamar “terapia combinada”. La combinación de ácido clavulánico, un inhibidor suicida de las  $\beta$ -lactamasas de clase A, junto con amoxicilina, lleva en uso clínico desde finales de la década de los 70 bajo el

nombre de Augmentin® (Figura 1.34). Así, las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas son erradicadas más eficientemente con la combinación de los dos compuestos (Sánchez Navarro, 2005), y a pesar de su uso generalizado, no ha perdido su eficacia en terapia (Neu *et al.*, 1993).



**Figura 1.34.** Mecanismo de acción de Augmentin®. El clavulanato inactiva la  $\beta$ -lactamasa, y la amoxicilina se une a una transpeptidasa de la pared celular (PBPs), bloqueándola.

Existen otras combinaciones de  $\beta$ -lactámicos e inactivadores de  $\beta$ -lactamasas en el mercado (Timentin® y Zosyn®), así como la combinación del antibiótico semisintético ampicilina con un inhibidor de lactamasas, con el nombre de Unasyn®.

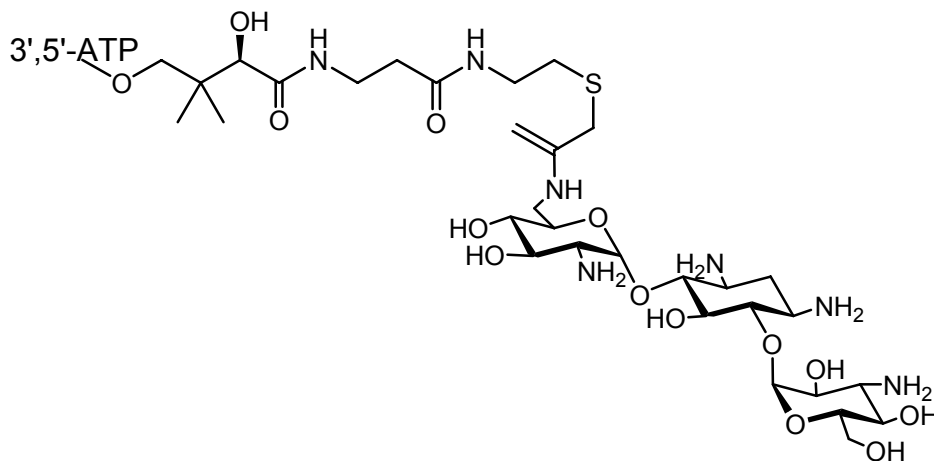
La resistencia a vancomicina en enterococos se debe a la síntesis de precursores del peptidoglicano con un extremo alterado que es incapaz de unirse al antibiótico. Un trabajo reciente muestra la síntesis de compuestos que facilitan el corte selectivo de dichos extremos del peptidoglicano de la pared de bacterias resistentes (Chiosis y Boneca, 2001). Estos compuestos fueron capaces de reducir la CMI de vancomicina para *Enterococcus faecium* de 500 mg/L a 62 mg/L. Este tipo de estrategia está siendo estudiada con el fin de inhibir los transportadores de membrana que eliminan una gran variedad de compuestos del interior celular, sin discriminarlos por su estructura o mecanismo de acción.

Varios compuestos peptidomiméticos han sido capaces de potenciar la actividad de la fluoroquinolona levofloxacin inhibiendo el transportador MDR

en *Pseudomonas aeruginosa* (Renau *et al.*, 2002). Otros transportadores más selectivos, como la proteína transportadora Tet(B) de *E. coli*, pueden ser bloqueados efectivamente, como se evidencia de la potencia de análogos semisintéticos de tetraciclinas en combinación con el compuesto doxiciclina (Nelson y Levy, 1999).

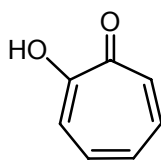
Así, todos estos ejemplos demuestran que la “terapia combinada” puede aumentar la actividad antibacteriana de antibióticos ya conocidos y efectivos, así como alargar el uso terapéutico de un fármaco ya aprobado, con los consecuentes beneficios comerciales (Cottarel y Wierzbowski, 2007). Gracias al resurgimiento de todos estos antibióticos, el desarrollo de inhibidores de los enzimas modificadores de antibióticos aminoglicósidos es bastante prometedor.

Williams y Northrop sintetizaron el primer inhibidor, que era un análogo bisustrato de kanamicina B y CoA (Figura 1.35). Este compuesto actuaba como un potente inhibidor frente a acetiltransferasas en ensayos *in vitro*, pero no recuperaba la sensibilidad de la cepa frente al antibiótico debido a que no penetraba al interior celular (Williams y Northrop, 1979).



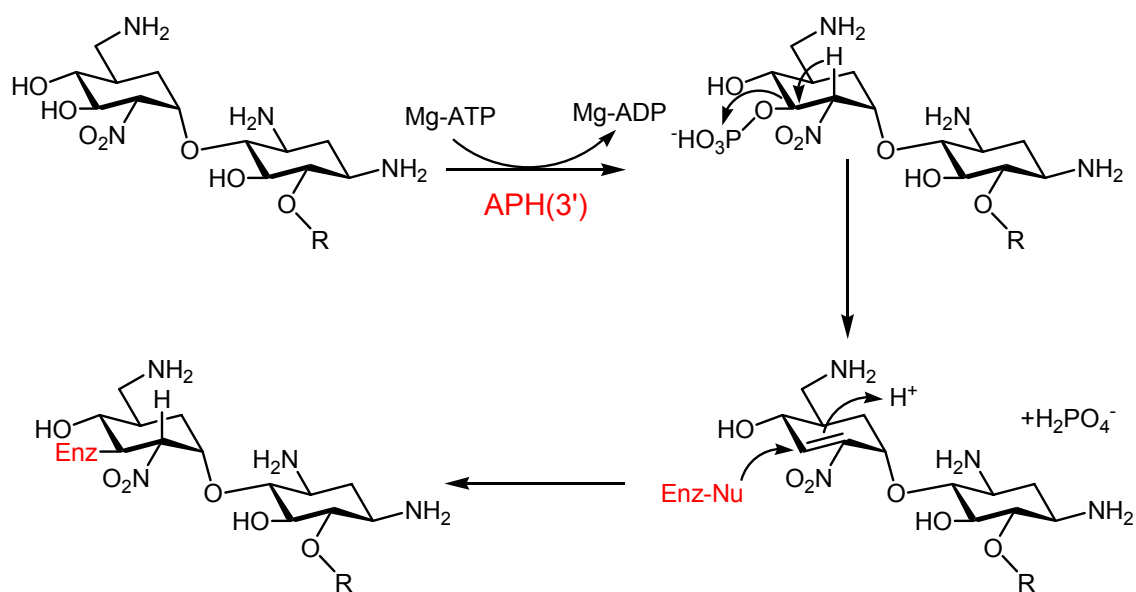
**Figura 1.35.** Análogo bisustrato descrito por Williams y Northrop.

Un cribado de productos naturales con el fin de descubrir compuestos que pudiesen potenciar la acción de los aminoglicósidos en bacterias resistentes, reveló un inhibidor del enzima ANT(2''), la 7-hidroxitropolona (Figura 1.36). Este compuesto es un inhibidor competitivo del ATP y es capaz de reestablecer la sensibilidad a antibióticos en cepas de *E. coli* que expresan el gen *ant(2'')* (Allen *et al.*, 1982).



**Figura 1.36.** Estructura química de la 7-hidroxitropolona.

Mobashery y colaboradores han sintetizado unos análogos de aminoglicósidos que tras fosforilarse por acción del enzima, son capaces de inactivarla (Roestamadji *et al.*, 1995). Entre ellos destaca la 2'-nitrokanamicina que inhibe la APH(3')-Ia y la APH(3')-IIa. Este compuesto actúa como sustrato del enzima, y tras la transferencia del grupo fosfato, éste se elimina con gran rapidez para generar una especie reactiva que se une covalentemente al centro activo del enzima, inactivándola (Figura 1.37).



**Figura 1.37.** Mecanismo de reacción propuesto de la APH(3') y la 2'-nitrokanamicina.

A pesar de la pluralidad de ejemplos de inhibidores de enzimas modificadores de antibióticos aminoglicósidos que existen en la literatura, todavía no se ha empleado ninguno de estos compuestos junto con el correspondiente aminoglicósido en clínica. Uno de los motivos podría ser la gran variedad de enzimas diferentes a inhibir junto con el desconocimiento de los mecanismos bioquímicos de muchos de estos enzimas (Vakulenko y Mobashery, 2003). Así, el conocimiento detallado de la forma de actuación de

los EMAs y de sus propiedades bioquímicas y estructurales, son fundamentales para desarrollar compuestos que actúen como inhibidores potentes de los enzimas y que sean capaces de recuperar la actividad antibiótica en una “terapia combinada”. La obtención y caracterización bioquímica de uno de estos enzimas —la ANT(6) de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*— junto con la demostración de que es posible aplicar una “terapia combinada” para recuperar la actividad de los antibióticos aminoglicósidos, es el tema del que trata la presente Memoria de Tesis Doctoral.

## **2. OBJETIVOS**



La resistencia bacteriana ha anulado la utilidad práctica de los antibióticos aminoglicósidos como fármacos efectivos. Es necesario el desarrollo y síntesis de antibióticos más eficaces e inhibidores potenciales de los enzimas modificadores, con el fin de aplicar en un futuro una “terapia combinada” que haga revertir la resistencia de las cepas a dichos antibióticos. Para ello es preciso un conocimiento más profundo y exhaustivo de estos enzimas, así como de la interacción química y biológica entre el enzima y sus sustratos.

Así, en el presente trabajo de Tesis Doctoral nos planteamos dos objetivos globales:

- 1- Obtención y posterior caracterización bioquímica de un enzima modificador de antibióticos aminoglicósidos, la 6-adeniltransferasa de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*.
- 2- Recuperación de la actividad antibiótica de la estreptomicina en cepas bacterianas que expresan la 6-adeniltransferasa y que por lo tanto, son resistentes a dicho antibiótico.





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIALES.

Las cepas bacterianas y vectores utilizados en esta memoria se encuentran resumidos en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Cepas bacterianas y vectores usados en este estudio.

Cepas bacterianas y plásmidos	Descripción	Fuente
<b>Cepas</b>		
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>		CECT 461 Promega
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 lac1 69 (φ80d lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F- <i>dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) galλ</i> (DE3)	Promega
<b>Plásmidos</b>		
pUC18	2690 pb, Amp <sup>r</sup> , P <sub>lac</sub> , <i>lacI</i> , <i>lacZ'</i>	Stratagene
pGEM®-T Easy	3018 pb, Amp <sup>r</sup> , P <sub>T7</sub> , P <sub>SP6</sub> , <i>lacZ</i> , f1 ori	Promega
pET-28b(+)	Vector de expresión, 5368 pb, Kan <sup>r</sup> , P <sub>T7</sub> , <i>lacI</i> , f1 ori, secuencia codificadora para colas de histidinas a ambos lados del sitio de policlonaje, sitio de corte de trombina	Novagen

Los cebadores de PCR fueron suministrados por Isogen y la EcoTaq ADN-polimerasa por Ecogen. La T4 ADN-ligasa, los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* y el patrón de pesos moleculares “1 kb DNA Ladder” fueron suministrados por MBI Fermentas.

La purificación de los productos de PCR se realizó con el “PCR Purification Kit” de Promega. La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo con el “Perfectprep® Gel Cleanup Kit” de Eppendorf. La obtención de plásmido purificado a partir de un cultivo bacteriano se hizo con el “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit” de Sigma.

La agarosa D-1 Medium EEO para analizar muestras de ADN por electroforesis, así como los componentes del medio de cultivo Luria-Bertani (extracto de levadura, triptona y NaCl) y el medio de cultivo Mueller-Hinton, fueron suministrados por Pronadisa.

La lisozima fue suministrada por USB, la DNasa por Roche, y la trombina por GE Healthcare. Los antibióticos estreptomicina, neomicina B, kanamicina A y espectinomicina utilizados en este trabajo, así como el ATP, se adquirieron en Sigma-Aldrich. La neamina, obtenida a partir de la hidrólisis del antibiótico

neomicina, fue cedida por el grupo del Dr. Juan Luis Asensio. El IPTG y el imidazol fueron suministrados por Acros Organics.

La resina de  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA-agarosa (35-40  $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL}$  resina) fue suministrada por Agarose Bead Technologies. Las columnas cromatográficas Glass Econo-Column<sup>®</sup> ( $\varnothing=2.5$  cm) para la purificación de proteína se adquirieron en Bio-Rad.

El reactivo de Bradford y la solución de acrilamida/bis-acrilamida 30% 29:1 para preparar geles de poliacrilamida se adquirieron en Bio-Rad, y el patrón de pesos moleculares “Low Molecular Weight Calibration Kit” en GE Healthcare.

Las membranas de diálisis Spectra/Por<sup>®</sup> adecuadas para la diálisis de proteínas de peso molecular superior a 12.000-14.000 Da, son de la marca Spectrum.

La amplificación de ADN se realizó en un Mastercycler Personal de Eppendorf. Los geles de agarosa para electroforesis de ADN se resolvieron en una cubeta RunOne<sup>™</sup> Electrophoresis Cell de EmbiTec, y los de acrilamida/bis-acrilamida para SDS-PAGE de proteínas en una cubeta MiniProtein<sup>®</sup> 3 de Bio-Rad. El análisis densitométrico de ambos tipos de geles se realizó en un fotodocumentador Gene Flash Bio Imaging de Syngene LTD empleando el programa informático GeneTools 3.07.

Los cultivos celulares se incubaron en un agitador orbitálico termostatzado Lab-Shaker de Adolf Kühner AG, y las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro VIS-UV SPECTRAmax-384 PLUS de Molecular Devices.

La reacción de adenilación se analizó en un HPLC Jasco PU-2089 Plus con un detector de absorbancia Jasco UV-2075 Plus.

Para el análisis de aminoácidos se purificó ANT(6) mediante una columna de afinidad HisTrap<sup>™</sup> de 1 mL ( $\sim 15 \mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{ml}$  de medio) de GE Healthcare en un FPLC ÄKTA prime plus.

Las muestras de proteína pura se liofilizaron en un liofilizador Lioalfa 6 de Telstar.

Los estudios de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un espectropolarímetro JASCO J-810 controlado por el programa informático Spectra Manager, y equipado con un Peltier Jasco PTC423-S. Los ensayos de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro Perkin Elmer LS50B con el programa informático FLWin.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), se realizaron en el espectrómetro Varian de 500 MHz. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian-500 de 125 MHz.

## 2. MÉTODOS.

Las técnicas básicas de manipulación de ADN, PCR, clonación, ligamiento, preparación de células competentes, transformación, preparación de medios de cultivo, etc., se realizaron según se describen en Sambrook *et al.*, 1989.

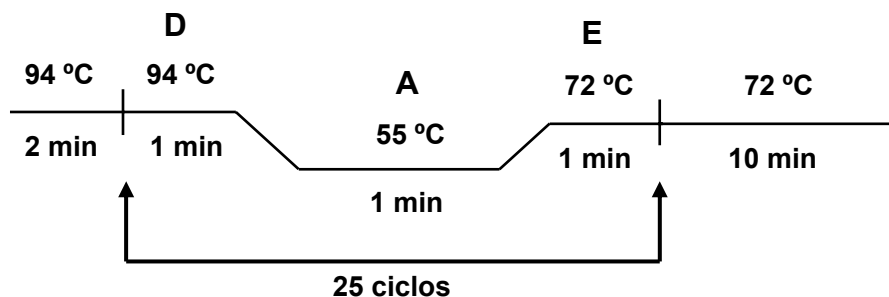
### 2.1. Amplificación del gen *aadk*, clonación y subclonación.

#### - Amplificación.

El ADN para la amplificación del gen *aadk* (número de acceso GeneBank: NC 000964) se obtuvo de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*. Para ello se resuspendió el liofilizado suministrado por la CECT en 1 mL de medio de cultivo LB y de éste se sembró una placa de LB-agar. La placa de LB-agar se creció O/N a 37 °C. Una de las colonias crecidas se resuspendió en 10 µL de medio LB y se procedió al lisado con 10 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, 1% Tritón X-100, EDTA 2 mM, pH 8.5).

Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores fueron para el cebador directo: 5'- GCCGCG**GAATTCC**ATGCGAAGTGAGCAG-3' y para el cebador reverso: 5'-CG**AAGCTTT**CACTTTACTGAGCAATAAA-3'. Las secuencias en negrita se corresponden con la secuencia diana para los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µL.

La mezcla de reacción se sometió al ciclo de amplificación que se detalla en la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Ciclo de amplificación del gen *aadk* (D= Desnaturalización, A=Anillamiento, E=Elongación).

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) con 0.4 µg/mL de bromuro de etidio. Posteriormente se purificó el fragmento de ADN amplificado.

#### **- Clonación en pGEM<sup>®</sup>-T Easy.**

El inserto *aadk* purificado de PCR se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy, específicamente diseñado para la clonación de productos de PCR. La reacción de ligación se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. Células competentes DH5α de *E. coli* se transformaron con la construcción pGEM-*aadk* y se sembraron en placas de LB-agar con 250 µg/mL de ampicilina. Las placas se incubaron O/N a 37 °C y de las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 8 al azar y se chequearon por PCR en las mismas condiciones que en la amplificación del gen *aadk*. Las colonias positivas se crecieron O/N a 37 °C en 5 mL de medio LB-ampicilina para purificar plásmido y éstos se utilizaron para secuenciar el inserto entre los promotores T7 y SP6. La secuenciación de ADN se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid-Universidad Complutense.

#### **- Subclonación en pET-28b(+).**

El plásmido pET-28b(+) y el inserto *aadk* procedente de la construcción pGEM-*aadk*, se sometieron por separado a una doble digestión con los

enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. En ambos casos, se digirió con 50 U de cada enzima de restricción, en un volumen final de 70 µL para el inserto y de 100 µL para el plásmido, durante 2 h a 37 °C, y siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras comprobar el final de la digestión al analizar las reacciones por electroforesis en gel de agarosa, se procedió a extraer el ADN de interés. En el caso del vector pET-28b(+) en forma lineal, se realizó una extracción de ADN con Fenol:Cloroformo:Isoamílico. En el caso del inserto *aadk*, se purificó de gel de agarosa.

Una vez obtuvimos vector e inserto doblemente digeridos y purificados, llevamos a cabo la ligación de ambos. La reacción se incubó O/N a 4 °C. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes DH5α de *E. coli* que se sembraron en placas de LB-agar con 26.3 µg/mL de kanamicina. Las placas se incubaron O/N a 37 °C y de las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 8 al azar para chequearlas por PCR en las mismas condiciones que en la amplificación del gen *aadk*. Las colonias positivas por PCR se crecieron O/N a 37 °C en 5 mL de LB-kanamicina para purificar plásmido. Éstos se secuenciaron entre el promotor T7 y el promotor SP6, utilizando en este último caso el cebador pETSP6 (5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3', Isogen) como cebador reverso específicamente diseñado para poder secuenciar insertos clonados en el vector pET-28b(+), con el fin de comprobar que la secuencia correspondía realmente al gen *aadk*.

Una de las colonias presentó una secuencia completamente correcta, y la construcción pET-*aadk* se transformó en células competentes BL21(DE3) de *E. coli* que se sembraron en placas de LB-agar con 26.3 µg/mL de kanamicina. De las colonias que crecieron O/N a 37 °C se seleccionaron al azar 8 de ellas y se chequearon por PCR en las mismas condiciones que para la amplificación del gen *aadk*. Se seleccionó la colonia número 2 para la posterior sobre-expresión de la proteína recombinante.



## 2.2. Sobre-expresión y purificación del extracto de proteínas.

### - *Sobre-expresión.*

Se creció un cultivo de la cepa recombinante BL21(DE3)/pET-*aadk* en 10 mL de LB con 10 µL de kanamicina (26 µg/mL) a 37 °C en agitación durante 24 h. A continuación se inoculó 1 L de LB con 1 mL de kanamicina, con un 1% del cultivo de la cepa. Se creció en agitación a 37 °C hasta que alcanzó una D.O.<sub>600 nm</sub> ~0.5 UA. En ese momento se indujo el cultivo con 1 mL de IPTG 0.5 M y se bajó la temperatura de incubación a 30 °C. Transcurridas ~24 h, el cultivo se centrifugó a 5000 g durante 20 min a 4 °C y el sedimento de células se utilizó para obtener un extracto proteico mediante tratamiento con lisozima (Wong *et al.*, 1995; Bastida *et al.*, 2001). El extracto de proteínas se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles del 13%.

### - *Purificación.*

La proteína se purificó mediante IMAC en una columna cromatográfica con resina de Ni<sup>2+</sup>-IDA-agarosa de alta densidad. Para la purificación del extracto crudo de proteínas se cargó la resina, lavada y equilibrada en tampón fosfato 20 mM pH 7.5, con un volumen de extracto igual al volumen de resina. Una vez cargado el extracto de proteínas, se lavó la resina con 2 volúmenes de tampón fosfato 20 mM pH 7.5, con el fin de eluir aquellas proteínas no unidas a la resina. A continuación, la proteína de interés se eluyó empleando 3 volúmenes de imidazol 0.25 M en tampón fosfato 20 mM a pH 9.0. Todas las fracciones se analizaron por electroforesis SDS-PAGE en geles del 13%. La proteína purificada en imidazol se dializó frente a H<sub>2</sub>O destilada a pH 7.5 y después se liofilizó en alícuotas de ~1mg para su posterior uso.

### - *Análisis de aminoácidos.*

Para el análisis de aminoácidos se purificó 5 mL de extracto crudo de proteínas en un FPLC con un gradiente de elución entre 0-0.5 M de imidazol. Se usó fosfato 20 mM pH 7.5 como tampón de unión y 0.5 M imidazol en

fosfato 20 mM pH 9.0 como tampón de elución. Una vez dializada la muestra en imidazol frente a H<sub>2</sub>O destilada a pH 7.5, se prepararon alícuotas con 10 µg de proteína pura por ensayo en un volumen final de 140 µL de agua destilada. Para el cálculo de la concentración de la muestra se utilizó el coeficiente de extinción molar teórico de 64150 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

El análisis se realizó por triplicado en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, en un analizador Biochrom 20 (Pharmacia).

#### **- Determinación de la concentración de proteína.**

En el caso de extractos crudos de proteína, medimos concentración con el reactivo de Bradford a una absorbancia de 595 nm (Bradford, 1976). Cuando se trata de muestras de proteína pura y conocido el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon^{280}$ ) de la ANT(6) a partir del análisis de aminoácidos, calculamos la concentración de proteína a partir de la ecuación de Lambert-Beer ( $Abs = C \cdot \epsilon \cdot l$ ) que relaciona concentración con absorbancia.

### **2.3. Eliminación del fragmento de histidinas.**

La eliminación del fragmento de histidinas se realizó por corte con trombina. Se utilizó una relación de 10 U de trombina por cada mg de ANT(6) purificada por Ni<sup>2+</sup>-IDA-agarosa. La proteína purificada en 0.25 M de imidazol, se dializó frente a H<sub>2</sub>O destilada a pH 7.5 y a continuación se añadió la trombina a la disolución. Tras 12 horas de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó la disolución y el sobrenadante se cromatografió en resina de Ni<sup>2+</sup>-IDA-agarosa con el fin de eliminar las colas de histidinas de la mezcla de reacción. Se comprobó que la proteína había sido cortada al presentar el tamaño esperado por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 13%, y se liofilizó para su posterior uso. La determinación de concentración de ANT(6) $\Delta$ His se realizó en todos los casos con el coeficiente de extinción molar obtenido experimentalmente para la ANT(6).

## 2.4. Fluorescencia.

Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico tanto en la excitación (275 y 295 nm) como en la emisión (295-400 nm). Los ensayos se realizaron a 25 °C, con una concentración de proteína de 1.5  $\mu$ M en fosfato 5 mM pH 7.5 en un volumen final de 3 mL. En todos los casos se restó al espectro de emisión la señal debida al tampón. La rendija de emisión y excitación se fijó en 10 nm.

La contribución de las tirosinas al espectro de emisión se calculó restando al espectro de emisión obtenido a  $\lambda_{exc}$  = 275 nm, el espectro de emisión obtenido a  $\lambda_{exc}$  = 295 nm multiplicado por un factor de normalización. Este factor es la resta de las intensidades de fluorescencia medidas con  $\lambda_{exc}$  = 275 nm y  $\lambda_{exc}$  = 295 nm a una longitud de onda de emisión de 380 nm, en la que no se espera contribución por parte de las tirosinas (Nuñez *et al.*, 2001).

## 2.5. Dicroísmo Circular.

El análisis de dicroísmo circular se realizó empleando cubetas con un paso óptico de 0.1 cm. La concentración de proteína utilizada para registrar los espectros fue entre 2.7- 4.6  $\mu$ M en el caso de la ANT(6), y entre 1-4.4  $\mu$ M para la ANT(6) $\Delta$ His, ambas en tampón Tris-HCl 5 mM pH 7.5 en un volumen final de 300  $\mu$ L.

Los espectros de DC en el ultravioleta lejano (195-240 nm) se registraron en un rango de temperaturas entre 25 °C y 80 °C y a una velocidad de barrido de 20 nm/min. Cada espectro es una media de cuatro registros que se promediaron automáticamente y a todos ellos se les restó el blanco debido al tampón empleado.

En aquellos ensayos con diferentes iones divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) se prepararon soluciones madre de la correspondiente sal y se añadió a la cubeta la cantidad adecuada para obtener una concentración final de 2.5, 5, 10, 20 y 30 mM de cada una de las sales.

En los ensayos de desnaturalización térmica se monitorizó el cambio de elipticidad a 222 nm. El cambio de temperatura en la muestra (de 25 a 90 °C), controlada con el sistema Peltier, se realizó a velocidad de calentamiento constante de 40 °C/h y la toma de datos se hizo cada 0.2 °C.

Todos los espectros se trataron y suavizaron con el programa informático Jasco Spectra Analysis.

La determinación de cada componente de estructura secundaria se efectuó con los espectros convertidos a Elipticidad por Residuo Medio ( $\Theta_{MRW}$ ), la cual fue calculada utilizando una masa de 110 Da por residuo (Kelly *et al.*, 2005). El análisis de los espectros de dicroísmo circular obtenidos se realizó con el paquete informático CDPPro compuesto por tres programas de cálculo: CONTIN, SELCON3 y CDSSTR (Sreerama y Woody, 2000). Se empleó el grupo de referencia nº4 que está compuesto por 43 proteínas cuyos espectros de dicroísmo circular y estructura secundaria son conocidos y están analizados entre 190-240 nm.

Las curvas de desnaturalización térmica se analizaron suponiendo un modelo de dos estados en el proceso de desnaturalización. Este modelo se ajusta a la ecuación 1 (Mayr *et al.*, 1993):

$$Y = (D_0 + m_D \cdot X) - \frac{(D_0 - N_0) + (m_D - m_N) \cdot X}{1 + \exp \frac{H_D(X - T_M)}{1.98 \cdot (273.15 + X) \cdot (273.15 + T_M)}} \quad \text{Ec. 1}$$

$D_0$ = valor de la señal de DC (en mdeg) del estado desnaturalizado a  $T=0$  °C

$m_D$ = pendiente del estado desnaturalizado

$N_0$ = valor de la señal de DC (en mdeg) del estado nativo a  $T=0$  °C

$m_N$ = pendiente del estado nativo

$T_M$ = temperatura (en °C) del punto de inflexión de la transición

$H_D$ = entalpía de van't Hoff asociada al proceso de desnaturalización a  $T=T_M$

## **2.6. Ensayos de autoagregación.**

Los ensayos se realizaron a 400 nm durante 15 min, registrando la señal cada 5 s. La concentración de ANT(6) fue entre 2.7-3.1  $\mu$ M en tampón Tris-HCl 5 mM pH 7.5 en un volumen final de 1 mL. Los ensayos se registraron a 25 °C y 45 °C. Al comienzo del ensayo, la proteína se deja equilibrar en la cubeta durante 100 s, pasado este tiempo se añade de una solución madre de  $MgCl_2$  la cantidad necesaria para obtener una concentración final en cubeta de 2.5, 10 o 30 mM. Transcurridos los 15 minutos, se calcula el incremento de absorbancia de la muestra entre la zona de equilibrio de la proteína y la absorbancia que se alcanza al final del ensayo.

## **2.7. Ultracentrifugación.**

Para el ensayo de equilibrio de sedimentación se prepararon muestras de ANT(6) y ANT(6) $\Delta$ His a una D.O. entre 0.1-1 UA en tampón Tris-HCl 5 mM pH 7.5, en un volumen de 100  $\mu$ L. Así mismo, se prepararon muestras de ambas proteínas con una concentración de  $MgCl_2$  de 2.5 y 20 mM para la ANT(6) y de 2.5 mM para la ANT(6) $\Delta$ His. También se analizaron los correspondientes blancos sin proteína como referencia.

Los ensayos de ultracentrifugación se llevaron a cabo en el Departamento de Química-Física de Macromoléculas Biológicas del Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC, en una ultracentrífuga analítica Bergman XLA de Culter.

## **2.8. Determinación de la actividad adeniltransferasa, efecto del pH, del $MgCl_2$ , y de otros iones divalentes, cálculo de parámetros y mecanismo cinético. Estudio de especificidad de sustrato.**

La determinación de actividad se hizo por HPLC equipado con una columna cromatográfica de intercambio iónico Vydac 3021C4.6 (0.46 x 25 cm). La fase móvil utilizada fue  $H_2O$ -TFA pH 3.0/10%  $CH_3CN$  con un flujo de 1mL/min y una

absorbancia de detección de 260 nm. Las condiciones de reacción fueron: 10mM de ATP, estreptomicina y  $\text{MgCl}_2$  y 3.75  $\mu\text{M}$  de ANT(6) en tampón Hepes 100 mM pH 7.5, en un volumen final de 1 mL y a temperatura ambiente. Se sacaron diversos tiempos de reacción, parando ésta al calentar la muestra a 100 °C durante 5-10 min. Tras centrifugar 5 min a 13000 rpm, se analizó la formación de producto adenilado por HPLC. El producto se identificó por  $^1\text{H}$ -RMN (O'hara *et al.*, 1988).

En primer lugar se realizó una recta patrón con diversas reacciones que contenían 3 mM de ATP, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  de ANT(6) y concentraciones de estreptomicina entre 60  $\mu\text{M}$  y 3 mM, en tampón Hepes 100 mM pH 7.5 a temperatura ambiente.

El estudio del efecto del pH se hizo con diferentes ensayos a una concentración de 3 mM de ATP, 2 mM estreptomicina, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 6  $\mu\text{M}$  de ANT(6) en tampón Hepes 100 mM y a temperatura ambiente. Las reacciones se ajustaron al pH deseado antes de añadir el enzima. El rango de pH estudiado fue entre 6.5 y 8.1.

A continuación nos propusimos hallar los parámetros cinéticos aparentes en el caso de cada sustrato. Las velocidades iniciales de los ensayos cinéticos se determinaron con reacciones en tampón Hepes 100 mM pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y 3  $\mu\text{M}$  de ANT(6) a temperatura ambiente. La concentración de ATP se fijó a 5 mM y se variaron las concentraciones de estreptomicina en el rango de 0.03-2 mM para calcular los parámetros cinéticos correspondientes a la estreptomicina. Para hallar los parámetros cinéticos del ATP, se fijó la concentración de estreptomicina a 5 mM y se variaron las concentraciones de ATP entre 0.015-2 mM. En el caso de los parámetros de la estreptidina, la concentración de ATP se fijó a 10 mM y la de estreptidina se varió entre 0.25 mM y 3 mM. Para comparar los parámetros cinéticos aparentes de la ANT(6) y ANT(6) $\Delta\text{His}$  con respecto al sustrato ATP, se llevaron a cabo reacciones en Hepes 100 mM pH 7.5, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de estreptomicina y 6  $\mu\text{M}$  de cada enzima. Las concentraciones de ATP se variaron en el rango de 0.03-2 mM.

En todos los casos las velocidades iniciales obtenidas se normalizaron con la cantidad de enzima utilizada en cada ensayo, y los datos se ajustaron a curvas hiperbólicas de tipo Michaelis-Menten. La determinación de los

parámetros cinéticos se realizó con las representaciones secundarias de Hanes-Woolf. Todas las representaciones y ajustes se hicieron con el módulo de cinética “Enzyme Kinetics” 1.1 del programa informático SigmaPlot 8.0.

El estudio del efecto del  $\text{MgCl}_2$  sobre la actividad se llevó a cabo con una serie de reacciones en las que se mantuvo constante la concentración de ATP a 3 mM, de estreptomicina a 2 mM y de ANT(6) a 6  $\mu\text{M}$ , y en las que se variaba la concentración de  $\text{MgCl}_2$  entre 3 y 40 mM. Todas ellas se realizaron en tampón Hepes 100 mM pH 7.5 a temperatura ambiente.

Para estudiar la influencia de diferentes iones divalentes sobre la actividad de la ANT(6), se fijaron unas condiciones de reacción de 3 mM de ATP, 2 mM de estreptomicina, 6  $\mu\text{M}$  de ANT(6) en tampón Hepes 100 mM pH 7.5 a temperatura ambiente. Los iones divalentes ensayados fueron magnesio, calcio y manganeso, a una concentración de 5 mM de la correspondiente sal en cada caso.

La determinación del mecanismo cinético se realizó fijando la concentración de estreptomicina a 0.7, 1, 2 y 5 mM. Para cada una de estas concentraciones, la cantidad de ATP se varió entre 0.015-2 mM. Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en tampón Hepes 100 mM pH 7.5, con 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y 3  $\mu\text{M}$  de ANT(6).

Los estudios de especificidad de sustrato se llevaron a cabo con los antibióticos aminoglicósidos neomicina B, neamina y espectinomicina. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente en tampón Hepes 100 mM pH 7.5, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM de ATP, 20  $\mu\text{M}$  de ANT(6) y 2 mM de cada antibiótico ensayado.

## **2.9. Modelización molecular.**

Los estudios de modelización molecular se realizaron con diferentes programas informáticos. La búsqueda de secuencias homólogas con estructura tridimensional conocida se hizo mediante el programa  $\Psi$ -BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ([http://www.ebi.ac.uk/bic\\_sw/](http://www.ebi.ac.uk/bic_sw/)) (Altschul *et al.*, 1997), en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína problema se compara con todas las secuencias de aminoácidos de proteínas depositadas

en el SWISS-PROT. Los resultados de  $\Psi$ -BLAST producen un alineamiento entre la proteína problema y proteínas homólogas. Las proteínas homólogas con estructura conocida se identificaron usando el servidor de reconocimiento de homología FUGUE (Shi *et al.*, 2001). Los resultados de los homólogos obtenidos con FUGUE resultan de alineamientos basados en estructura a partir de una base de datos (HOMSTRAD), usando tablas de sustitución específicas del ambiente proteico generadas automáticamente seleccionando los mejores alineamientos. La predicción de estructura secundaria de la ANT(6) se realizó con el servidor JPRED (<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>) y la determinación de los porcentajes de cada tipo estructural con GOR IV ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)). La búsqueda de homólogos remotos por predicción de plegamiento se realizó mediante los servidores 3D-PSSM (<http://www.bmm.icnet.uk/~3dpssm/>), FUGUE y SAM-T99 (<http://www.soe.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T99-query.html>). El alineamiento de secuencias se realizó con el programa CLUSTALW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson *et al.*, 1994) y se refinó con SEAVIEW (Galtier *et al.*, 1996). Por último, la modelización molecular de la estructura tridimensional se hizo con el programa MODELLER (<http://guitar.rockefeller.edu/modeller/modeller.html>) (Sali y Blundell, 1993). La energía final y la minimización de la estructura se desarrolla usando el campo de fuerzas de SYBYL (<http://www.tripos.com/software/index.html>). Los modelos obtenidos fueron evaluados con PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) y con Verify3D. La superposición de la ANT(6) depositada en el Protein Data Bank y del monómero de la ANT(6) obtenido por modelización computacional se realizó con PYMOL.

## 2.10. Determinación de CMI.

Las cepas utilizadas en el estudio se inocularon en 5 mL de medio Mueller-Hinton y se crecieron en agitación a 37 °C. Transcurridas 24 h, se tomó un 1% de estos cultivos y se transfirieron a 5 mL de medio M-H. Se creció en agitación a 37 °C y pasadas 24 h se volvió a repetir el procedimiento anterior. Esta operación se realizó a lo largo de 4 días. En el quinto día se inoculó un 1% de



la cepa control BL21(DE3) de *E. coli* en 1 mL de M-H, y se creció a 37 °C en agitación hasta una D.O.<sub>600 nm</sub> ~ 0.5 UA. En ese momento se añadió una concentración de antibiótico entre 2-400 µg/mL procedente de una solución madre. Después de incubar ~24 h a 37 °C, se registró la D.O.<sub>600 nm</sub> de cada una de las muestras.

En el caso de la cepa BL21(DE3)/pET-*aadK* que sobre-expresa la ANT(6), se modificó ligeramente el anterior protocolo. Se inoculó un 1% de la cepa en 1 mL de M-H y se creció hasta una D.O.<sub>600 nm</sub> ~ 0.3 UA. En ese momento, la temperatura de incubación se bajó a 30 °C y se indujo el cultivo con 10 µL de 0.5 M de IPTG. Cuando la D.O.<sub>600 nm</sub> alcanzó un valor de ~0.5 UA, se añadió la concentración deseada de cada antibiótico procedente de una solución madre. Las muestras se incubaron a 30 °C durante ~24 h y tras este tiempo se registró la D.O.<sub>600 nm</sub> de cada una de las muestras.

Los compuestos ensayados fueron: estreptomicina, neomicina B, neamina, espectinomicina y estreptidina, a unas concentraciones entre 2-400 µg/mL.

En el caso en el que se estudió la recuperación de actividad del antibiótico estreptomicina al administrarlo junto con estreptidina, se añadieron ambos compuestos cuando la D.O.<sub>600 nm</sub> alcanzó un valor de ~0.5 UA. Las concentraciones ensayadas de estreptomicina fueron 10, 25, 50, 60, 70, 80, 100 y 200 µg/mL, frente a 50, 100 y 400 µg/mL de estreptidina.

### 2.11. Obtención de estreptidina, AMP-estreptidina y caracterización.

Se realizó la hidrólisis de 0.5 g de estreptomicina con 150 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 4 mL de metanol a temperatura ambiente (Peck *et al.*, 1946). Tras 48-72 h de reacción, se obtuvo un precipitado blanco que se filtró y lavó con metanol. Este producto se identificó como estreptidina por espectrometría de masas con ionización por electrospray (EM-ESI) realizada en los Servicios Espectroscópicos del Centro de Química Orgánica “Manuel Lora Tamayo”, CSIC, y por <sup>1</sup>H-RMN.

Se llevaron a cabo reacciones a temperatura ambiente en Hepes 100 mM pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 20 mM de estreptidina y 24 µM de ANT(6).

A las 48 h de reacción, se identificó el producto AMP-estreptidina por espectrometría de masas,  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.

En la  $^1\text{H}$ -RMN, se indica el disolvente deuterado, la temperatura y pH a la que se realizó el espectro, así como la frecuencia en la que está registrada el mismo. También se indican los desplazamientos químicos en la escala  $\delta$  (ppm), la multiplicidad de las señales (s: singlete, d: doblete, t: triplete, c: cuartete, q: quintuplete, m: multiplete), el número de protones (deducidos por integración) y el valor de las constantes de acoplamiento  $J$  (Hz).

En la  $^{13}\text{C}$ -RMN, se indican los desplazamientos químicos en la escala  $\delta$  (ppm).

- Estreptidina:

**$^1\text{H}$ -RMN** (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K, pH 3.0):  $\delta$  = 3.25–3.45 (m, 6H).

**EM (ESI):** 263.0  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

- AMP–estreptidina:

**$^1\text{H}$ -RMN** (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K, pH 3.0):  $\delta$  = 1.06 (t, 1H,  $J$  = 7.1Hz), 3.45 (m, 5H), 3.90 (dd, 1H,  $J$  = 9.3, 18.8 Hz), 4.09 (m, 1H), 4.18 (d, 1H,  $J$  = 1.6 Hz), 4.27 (m, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.39 (t, 1H,  $J$  = 4.56 Hz), 4.45 (t, 1H,  $J$  = 5.4 Hz), 6.07 (d, 1H,  $J$  = 5.2 Hz), 8.34 (d, 1H,  $J$  = 4.5 Hz), 8.52 (t, 1H,  $J$  = 5.7 Hz).

**$^{13}\text{C}$ -RMN** (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  = 15.3, 58.2, 59.0, 65.5, 70.2, 70.6, 71.6, 74.3, 77.1, 84.3, 88.2, 145.3, 158.0, 158.3.

**EM (ESI):** 592.2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 614.1  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

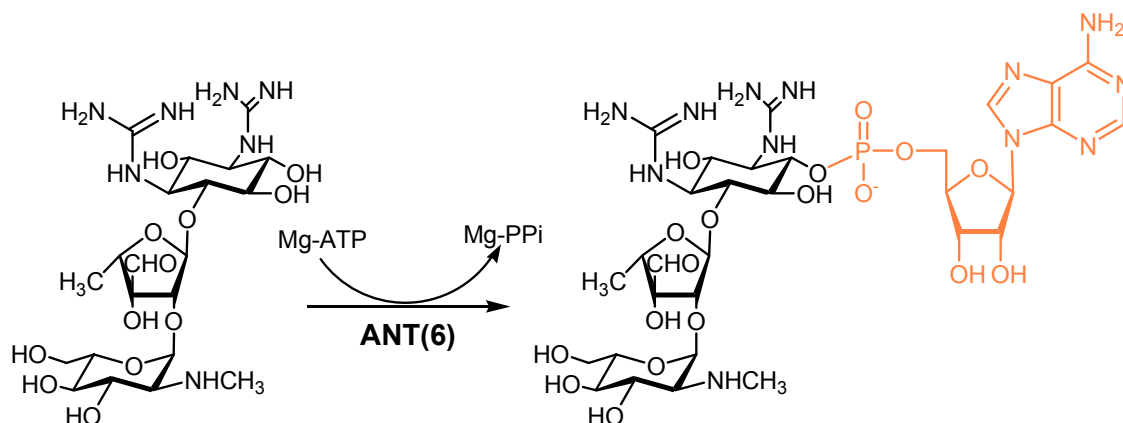


## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



- **Obtención de la 6-adeniltransferasa de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*.**

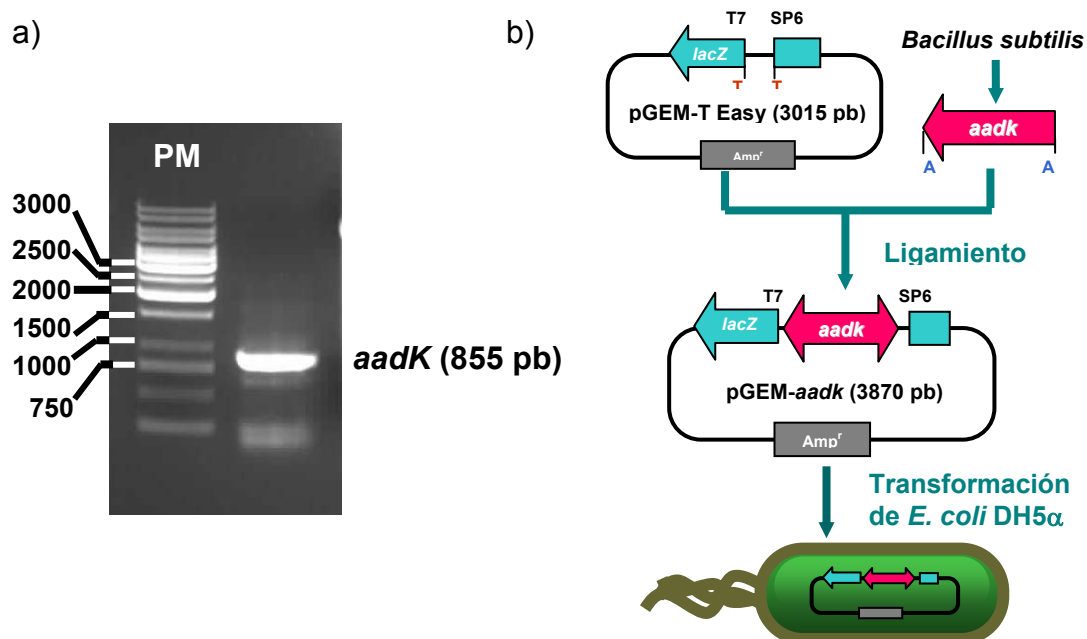
La 6-adeniltransferasa es un enzima modificador de antibióticos aminoglicósidos que se encarga de transferir el grupo AMP procedente del ATP al hidroxilo en posición 6 del antibiótico estreptomicina (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Reacción de adenilación de la estreptomicina catalizada por la ANT(6).

El gen *aadK* que codifica para esta proteína que confiere resistencia a estreptomicina en *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*, fue descrito por primera vez por el grupo de Kono y colaboradores (Kono *et al.*, 1987; O'hara *et al.*, 1988; Ohmiya *et al.*, 1989).

Con el fin de sobre-expresar el enzima, realizamos la amplificación del gen mediante PCR a partir del ADN de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*, introduciendo las dianas de restricción *EcoRI* y *HindIII* en el diseño de los cebadores. La amplificación fue específica obteniéndose una banda de 855 pb correspondiente al tamaño del gen *aadK* (Figura 4.2a).



**Figura 4.2.** a) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la amplificación por PCR del gen *aadk*. PM= Patrón de pesos moleculares en pb. b) Esquema de la clonación del gen *aadK* en el vector pGEM®-T Easy.

A continuación, dicho fragmento se clonó en el vector pGEM®-T Easy con el fin de proceder a su secuenciación (Figura 4.2b). A partir de la secuencia traducida a aminoácidos (Figura 4.3) podemos obtener algunas de las características teóricas de la proteína (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). Esta proteína tiene un peso molecular estimado de 33907.6 Da, un punto isoeléctrico de 4.95 y un coeficiente de extinción molar a 280 nm de  $67060 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

```

atgcgaagtgagcaggaaatgatggacatttttttggacttttgctttgaacgatgagaga
M R S E Q E M M D I F L D F A L N D E R
atccgattgggtcacttttgggaaggggtcacgtacaaacagaaatatccctcctgacaacttc
I R L V T L E G S R T N R N I P P D N F
caagattatgacatctcgtattttgttaactgatgtagaatcttttaaagaaaatgatcag
Q D Y D I S Y F V T D V E S F K E N D Q
tggctcgaaatctttgggaagcgcattatgatgcaaaaaccagaagatatggagcttttt
W L E I F G K R I M M Q K P E D M E L F
cctcccgaattaggttaattgggttttcatacattattctttttgaggatggcaacaatta
P P E L G N W F S Y I I L F E D G N K L
gatctaacccttattccaattcgtgaagcagaagattattttgctaataacgatgggttg
D L T L I P I R E A E D Y F A N N D G L
gttaaggtattgcttgataaggattcgttcactataaagtgaccccaaatgatcgc
V K V L L D K D S F I N Y K V T P N D R
caatactggataaaaaggccgactgcaaggggaatttgatgattgctgtaatgagttctgg
Q Y W I K R P T A R E F D D C C N E F W
atggtttcgacttacgtagtaaaaggactagcaagaaatgaaatcctttttgccattgac
M V S T Y V V K G L A R N E I L F A I D
catttaaattgaaattgtacgtcctaattttattgagaatgatggcctggcataatcgcatct
H L N E I V R P N L L R M M A W H I A S
cagaaaggggtattcatttagtatggggaagaactataaatttatgaagcggtagcttttca
Q K G Y S F S M G K N Y K F M K R Y L S
aataaagaatgggaggaactcatgtctacatatctgtgaatgggtatcaggaaatgtgg
N K E W E E L M S T Y S V N G Y Q E M W
aagtcttttatttacttgctatgcattatttagaaagtattcaaaagctgtatcagaaggt
K S L F T C Y A L F R K Y S K A V S E G
cttgcatataagtatcctgattacgatgaaggtattactaagtatacgggaaggtatttat
L A Y K Y P D Y D E G I T K Y T E G I Y
tgctcagtaaag
C S V K

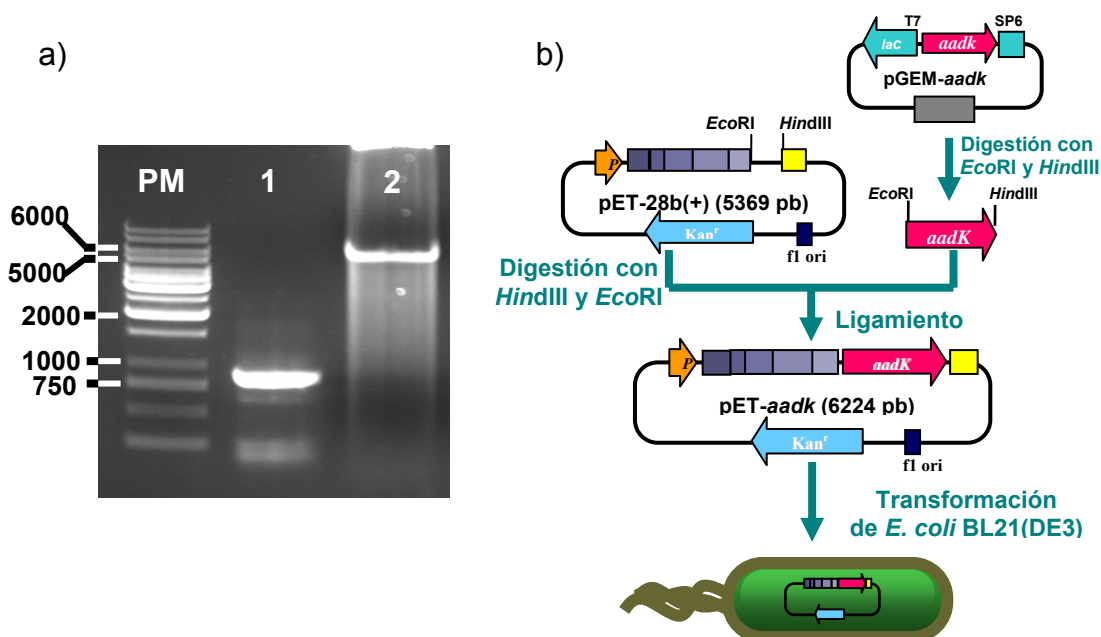
```

**Figura 4.3.** Secuencia del gen *aadk*. En verde se muestra la traducción a aminoácidos.

Una vez comprobada que la secuencia era la correcta, el gen *aadk* se subclonó en el vector de expresión pET-28b(+). Este vector de expresión de alto número de copias y cuyo promotor proporciona niveles altos de sobre-expresión de la proteína recombinante, codifica para un péptido que contiene una cola de seis histidinas a ambos lados del sitio de policlonación. En nuestra construcción, la proteína de interés se expresó con una cola de histidinas en el extremo N-terminal. Esta cola de histidinas presenta una afinidad alta por cationes divalentes, lo que nos facilitará su purificación posterior a partir del extracto total de proteína soluble mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) (Chaga, 2001). Para la subclonación, tanto el inserto como el vector se sometieron a digestión con los enzimas de restricción

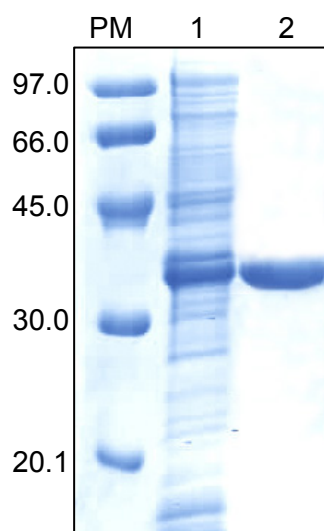


*EcoRI* y *HindIII* (Figura 4.4a). Tras el ligamiento de ambos, se procedió a la transformación de *E. coli* BL21(DE3) con dicha construcción (Figura 4.4b).



**Figura 4.4.** a) Digestión con *EcoRI* y *HindIII*. 1= gen *aadK*; 2= vector pET-28b(+). PM= Patrón de pesos moleculares en pb. b) Esquema de la subclonación del gen *aadK* en el vector de expresión pET-28b(+).

En nuestro caso, la expresión de proteína bajo el control del promotor T7 inducible por IPTG (Studier *et al.*, 1990), nos permitió una sobre-expresión de la ANT(6) en la fracción de proteína soluble (Figura 4.5). La purificación de ANT(6) en un solo paso por IMAC con elución por imidazol nos permitió obtener la proteína con un grado de pureza superior al 85% y una productividad final de ~50 mg de ANT(6) pura por litro de cultivo.



**Figura 4.5.** Gel SDS-PAGE al 13% de la sobre-expresión y purificación de la ANT(6). PM= Patrón de pesos moleculares en kDa; 1= Extracto de proteínas tras tratamiento con lisozima; 2= ANT(6) eluída, tras purificación por resina de Ni<sup>2+</sup>, con 0.25 M de imidazol.

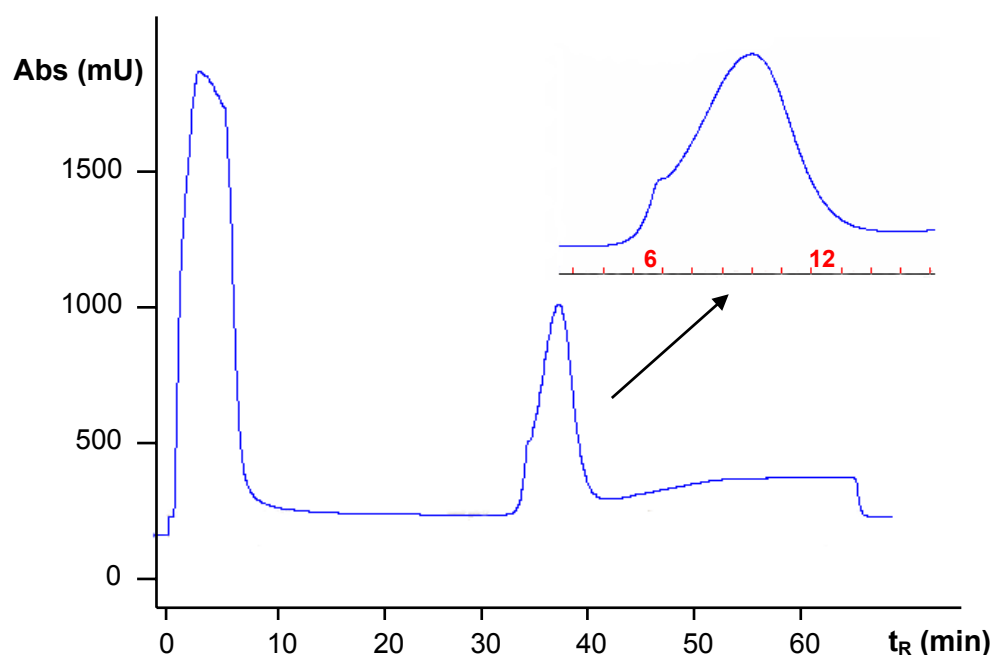
La proteína recombinante tiene 33 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal por lo que su peso molecular —deducido a partir de la secuencia— es de 37421.5 Da. El punto isoeléctrico teórico de 5.65 es ligeramente superior al calculado para la proteína nativa, mientras que el coeficiente teórico de extinción molar a 280 nm disminuye a 64150 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

- **Caracterización bioquímica de la ANT(6).**

- **Análisis de aminoácidos.**

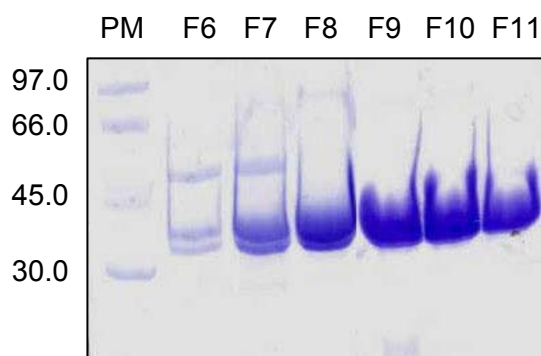
Se procedió a la realización de un análisis de aminoácidos de la ANT(6) con el fin de determinar el coeficiente de extinción molar experimental, así como para obtener una identificación inicial de la proteína.

Del extracto crudo de proteínas, se purificó ANT(6) mediante IMAC con un FPLC, obteniéndose un pico de elución mayoritario a una concentración ~0.25 M de imidazol. En este pico se observó la existencia de otro pico pequeño que solapaba con el mayor (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Cromatograma de purificación de un extracto de proteínas por FPLC. En el inserto se muestra el pico de elución de interés ampliado con el número de las fracciones.

A continuación, se procedió al análisis por electroforesis SDS-PAGE de las diferentes fracciones que componían el pico con el fin de descartar aquellas que presentasen otras proteínas que no fuesen la ANT(6), ya que la pureza de la muestra es fundamental a la hora de realizar el análisis de aminoácidos. El análisis de las fracciones nos mostró que en las primeras fracciones había otras proteínas, y que a partir de la fracción 9 sólo se encontraba la ANT(6) (Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Gel SDS-PAGE al 13% de la purificación de un extracto de proteínas por FPLC y las diferentes fracciones analizadas eluidas en 0.25 M de imidazol. PM= Patrón de pesos moleculares en kDa.

Así, elegimos la fracción 10 y 11 para realizar el análisis de aminoácidos. El cálculo de la cantidad de proteína necesaria para realizar el análisis se realizó utilizando el coeficiente de extinción molar teórico.

Como primer criterio para identificar la proteína, se observa una buena correlación entre el número de aminoácidos esperados en función de la secuencia y el número de aminoácidos encontrados experimentalmente (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Resultados del análisis de aminoácidos.

Aminoácidos	Nº teórico de aa	$\bar{x} \pm \sigma$ del nº experimental
		de aa
<b>Asx<sup>a</sup></b>	40	42.7 $\pm$ 0.6
<b>Thr</b>	12	12.7 $\pm$ 0.6
<b>Ser</b>	23	24.7 $\pm$ 0.6
<b>Glx<sup>a</sup></b>	33	37.7 $\pm$ 0.6
<b>Gly</b>	18	19
<b>Ala</b>	12	13
<b>Cys</b>	4	1.7 $\pm$ 0.6
<b>Val</b>	14	13.4 $\pm$ 0.6
<b>Met</b>	17	16.4 $\pm$ 0.6
<b>Ile</b>	18	16.5 $\pm$ 0.6
<b>Leu</b>	25	26
<b>Tyr</b>	19	19
<b>Phe</b>	18	18
<b>His</b>	9	7.7 $\pm$ 1.1
<b>Lys</b>	20	19.7 $\pm$ 0.6
<b>Arg</b>	17	17
<b>Pro</b>	11	12 $\pm$ 1
<b>Trp</b>	7	N.D. <sup>b</sup>

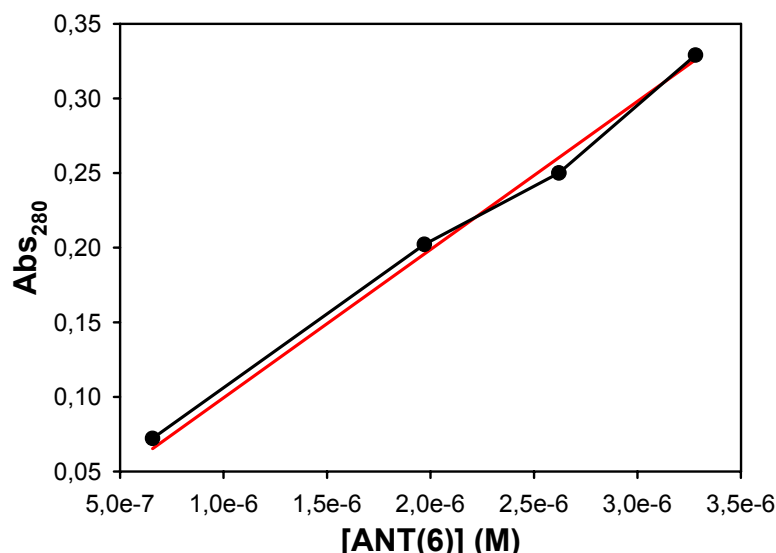
<sup>a</sup> Tanto la asparagina como la glutamina se desaminan durante el proceso de análisis de aminoácidos y se detectan como ácido glutámico y aspártico respectivamente.

<sup>b</sup> No determinado. Los triptófanos que no han sido alquilados previamente se destruyen durante el análisis.

Para el cálculo del coeficiente de extinción molar, sólo se consideraron aquellos aminoácidos cuyo número determinado experimentalmente se desviaba menos de tres unidades respecto al valor teórico.

Con la misma muestra que se utilizó para el análisis de aminoácidos se realizó una recta de calibrado con absorbancias a 280 nm comprendidas entre 0.07 y 0.33 UA (Figura 4.8). Así, con las concentraciones corregidas en base a los resultados del análisis de aminoácidos pudimos determinar el coeficiente de

extinción molar experimental como la pendiente de dicha recta de calibrado. El resultado obtenido fue de  $\epsilon^{280} = 99374.9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A la vista de este resultado podemos comprobar que la tendencia habitual de utilizar el coeficiente de extinción molar teórico para el cálculo de concentración de proteína supondría una sobrestimación de la concentración de 1.6 veces.



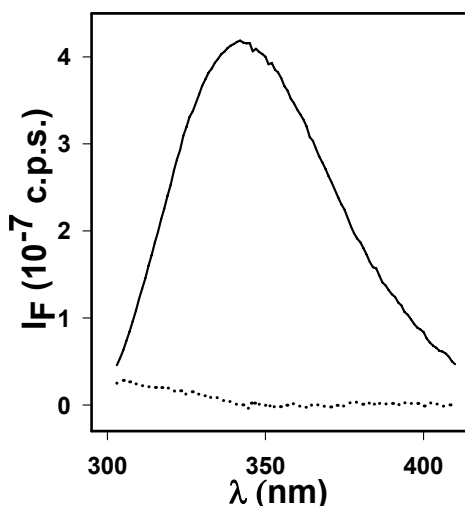
**Figura 4.8.** Recta de calibrado de absorbancia a 280 nm frente a la concentración de proteína corregida por el análisis de aminoácidos. En rojo se muestra el ajuste de los datos experimentales a una regresión lineal.

#### - Estudio de fluorescencia.

La espectroscopía de emisión de fluorescencia permite determinar el ambiente local en el que se encuentran los residuos de triptófano en función de factores externos, como el pH, fuerza iónica, temperatura y condiciones desnaturalizantes. En general, el espectro de emisión en una proteína suele estar dominado por el del triptófano, ya que la sensibilidad de éste es mayor que la de otros fluoróforos, como las tirosinas (Ghisla *et al.*, 1974). La ANT(6) posee en su secuencia 19 tirosinas y 7 triptófanos responsables de sus propiedades de fluorescencia.

La excitación a 275 nm da lugar a un espectro de emisión total que posee un máximo a 345 nm (Figura 4.9). Este máximo prácticamente coincide con el descrito para triptófanos libres en solución acuosa (348-350 nm) (Lakowicz, 1999). Esto indicaría que el microambiente de los triptófanos en la ANT(6)

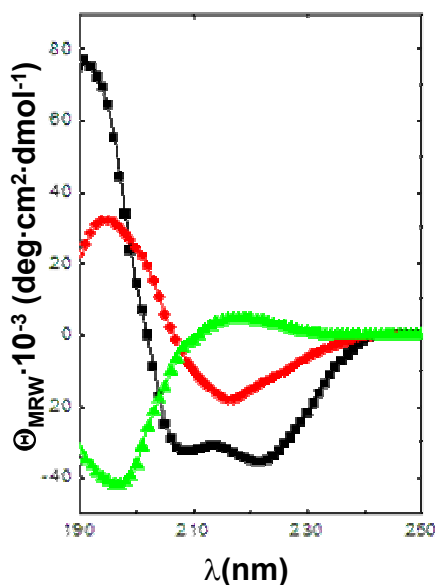
debido al plegamiento de la proteína es significativamente hidrofílico y que por lo tanto, estarían expuestos al medio. El espectro de emisión obtenido tras la excitación a 295 nm fue prácticamente idéntico al obtenido anteriormente, lo cual indica una contribución casi nula de las tirosinas al espectro de emisión total de fluorescencia de la ANT(6). Esta contribución es mucho menor de la esperada dado el alto número de tirosinas que posee la proteína en su secuencia, y podría ser debida a la existencia de transferencia de energía de fluorescencia de las tirosinas a los triptófanos cercanos o porque se produzca una desactivación bimolecular de fluorescencia (“*quenching*”) por otras cadenas laterales de aminoácidos próximos (Serrano *et al.*, 2006).



**Figura 4.9.** Espectro de emisión de fluorescencia de la ANT(6) en fosfato 5 mM pH 7.5. La línea sólida representa el espectro obtenido tras la excitación a 275 nm. La línea discontinua es la contribución de las tirosinas al espectro global.

#### - Estudio de estructura secundaria. Dicroísmo Circular.

Los diferentes tipos de estructura secundaria de proteínas y péptidos poseen espectros de DC característicos en la zona del ultravioleta lejano (180-250 nm) (Figura 4.10).



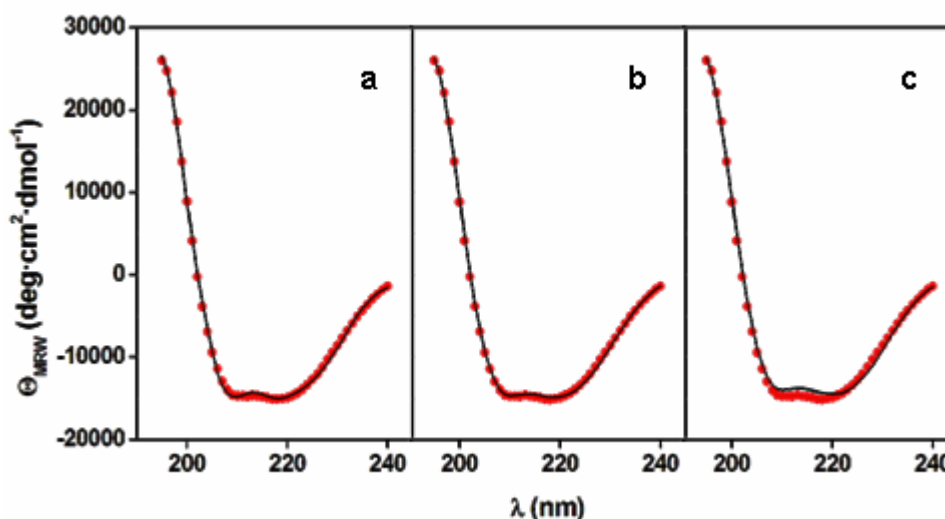
**Figura 4.10.** Espectros de dicroísmo circular de varios tipos de estructura secundaria: (■)  $\alpha$ -hélice, (●)  $\beta$ -lámina, y (▲) estructura desordenada.

Los espectros de dicroísmo en esta región, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de aminoácidos entre sí (Kelly *et al.*, 2005).

Existen numerosos algoritmos que usan los datos de DC obtenidos en el ultravioleta lejano para realizar una estimación de la composición de la estructura secundaria de las proteínas. La mayoría emplean bases de datos que contienen los espectros de DC de proteínas resueltas por difracción de rayos-X. En nuestro caso el análisis de los espectros de DC obtenidos se realizó con el paquete informático CDPPro compuesto por tres programas de cálculo: CONTIN, CDSSTR y SELCON3 (Sreerama y Woody, 2000). Se empleó el grupo de referencia nº 4 que está compuesto por 43 proteínas cuyos espectros de dicroísmo circular y estructura secundaria son conocidos y están analizados entre 190-240 nm. Este grupo de referencia es el más adecuado en nuestro caso ya que es el que está integrado por el mayor número de proteínas con estructuras secundarias resueltas en el mismo rango del ultravioleta lejano en el que realizamos los ensayos.

Los espectros de DC obtenidos a 25 °C de la ANT(6) se ajustaron con muy buena correlación a los valores teóricos (Figura 4.11). Además, el resultado de los tres programas fue muy similar, por lo que se puede considerar la utilización de la media de los tres programas con su correspondiente desviación estándar

como resultado. La señal de los espectros de la ANT(6) posee dos mínimos a ~208 nm y ~222 nm y un máximo a ~192 nm, los cuales son característicos de una estructura secundaria predominantemente de tipo  $\alpha$ -hélice (Pelton y McLean, 2000).



**Figura 4.11.** Espectros de DC a 25 °C de la ANT(6). Los puntos rojos representan los datos experimentales y la línea continua los ajustes de los espectros teóricos calculados con los programas informáticos: a) CONTIN, b) CDSSTR y c) SELCON3.

Al realizar el cálculo de la contribución de cada tipo de estructura con el programa CDPro, obtuvimos una contribución mayoritaria de  $\alpha$ -hélice del 47.2% (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Porcentaje de cada tipo estructural calculado con los tres programas informáticos con su correspondiente media y desviación estándar.

	CONTIN	CDSSTR	SELCON3	$\bar{x} \pm \sigma$
% $\alpha$ -hélice	48.2	45.8	47.7	47.2 $\pm$ 1.3
% $\beta$ -lámina	10.3	14.5	11.7	12.2 $\pm$ 2.1
% Giros	13.5	15.6	15.8	15 $\pm$ 1.3
% Desordenada	28	24.9	27.3	26.7 $\pm$ 1.6

La ANT(4') de *Staphylococcus aureus* tiene una estructura predominantemente de tipo  $\alpha$ -hélice (Sakon *et al.*, 1993). Según su estructura tridimensional, posee un 55% de  $\alpha$ -hélice y un 13% de  $\beta$ -lámina. En 2006 se publicó un trabajo en el que se realizaba un estudio de dicroísmo circular de

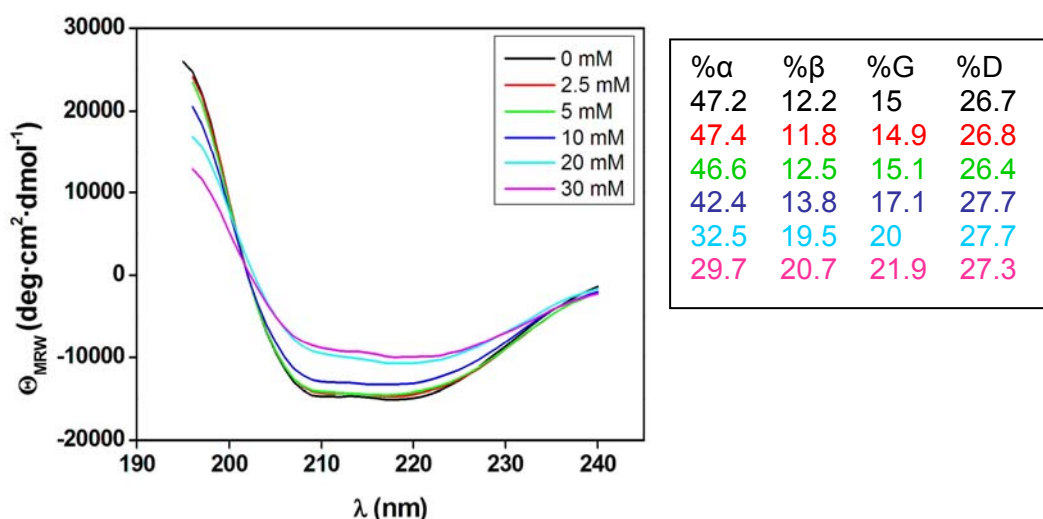


una ANT(6) de *Corynebacterium acetoacidophilum* expresada en *E. coli* (Jana *et al.*, 2006). En él se determina una estructura mayoritariamente de tipo  $\alpha$ -hélice al igual que en nuestro caso, estimándose un porcentaje de 65.7% de  $\alpha$ -hélice y una cantidad de  $\beta$ -lámina de un 8.4% con el programa informático SELCON3. Así mismo, recientemente se depositó en el Protein Data Bank la estructura tridimensional de la ANT(6) de *Bacillus subtilis*, la cual presenta un 47% de  $\alpha$ -hélice y un 14% de  $\beta$ -lámina, coincidiendo con los datos experimentales obtenidos en nuestro caso por DC. Hasta la fecha todas las adeniltransferasas descritas presentan una estructura predominante de tipo  $\alpha$ -hélice.

#### Estudio del efecto de diferentes iones divalentes sobre la estructura secundaria de la ANT(6).

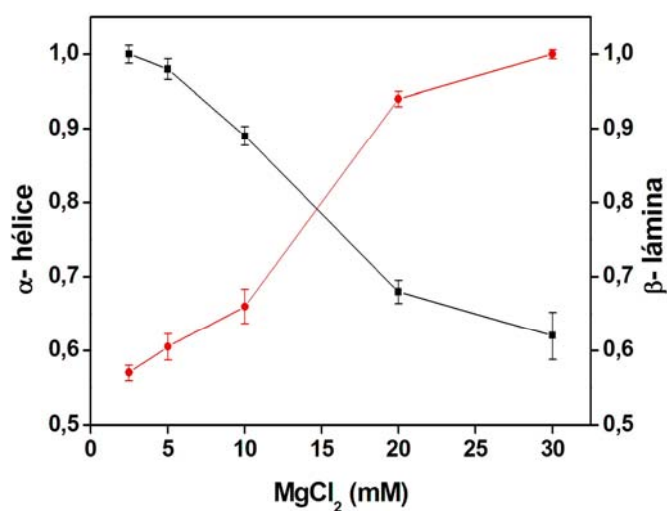
La ANT(6) es una proteína que precisa del cofactor magnesio para poder llevar a cabo la reacción de adenilación. Por ello, nos planteamos estudios de dicroísmo circular en los que estuviese presente dicho cofactor a diferentes concentraciones, así como otros iones divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ), con el fin de averiguar si su presencia podía ejercer algún efecto sobre la estructura secundaria de la proteína.

En el caso de los ensayos con  $\text{MgCl}_2$ , se observó que a concentraciones crecientes existía una transición de estructura tipo  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -lámina (Figura 4.12). En este tipo de transición los mínimos típicos de  $\alpha$ -hélice a  $\sim 208$  nm y  $\sim 222$  nm son menos intensos, lo mismo que el máximo a  $\sim 192$  nm. Por otro lado, el espectro típico de  $\beta$ -lámina se caracteriza por la presencia de un mínimo a  $\sim 216$  nm y un máximo entre 195-200 nm (Pelton y McLean, 2000). La transición observada se produce sobre todo a partir de 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ . De hecho, el porcentaje de  $\alpha$ -hélice pasa de 47.2% en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , a 32.5% en presencia de una concentración de 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ . A su vez, el porcentaje de  $\beta$ -lámina pasa de un 12.2% a un 19.5%. También es destacable el aumento en el porcentaje de giros a concentraciones crecientes de  $\text{MgCl}_2$ , pasando de un 15% en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , a 21.9% en presencia de una concentración de 30 mM de  $\text{MgCl}_2$ .



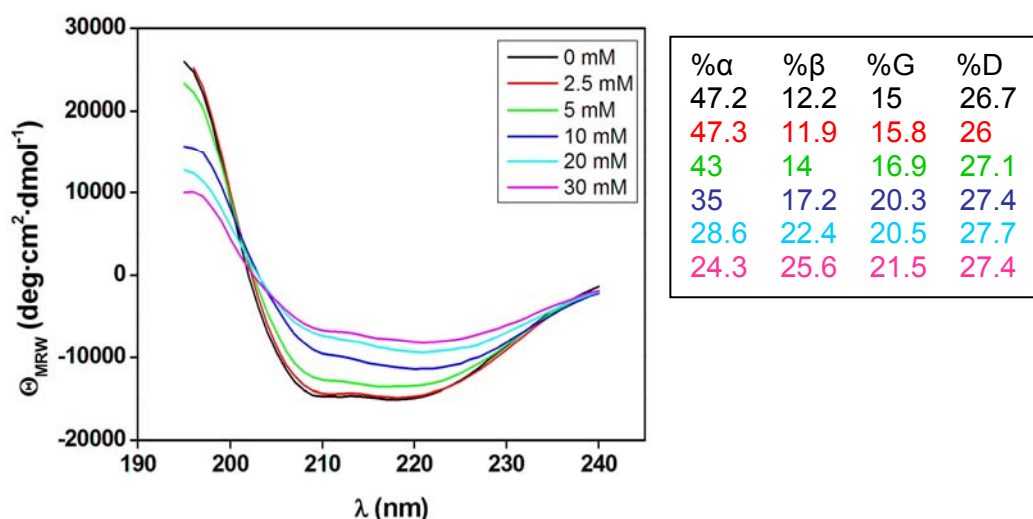
**Figura 4.12.** Espectros de DC de la ANT(6) a 25 °C en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y media de los porcentajes calculados para cada tipo estructural.  $\alpha$ =  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ =  $\beta$ -lámina, G= giros, D= estructura desordenada.

La representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y de  $\beta$ -lámina frente a la concentración de  $\text{MgCl}_2$ , nos permite determinar la concentración a la cual la mitad de la estructura de tipo  $\alpha$ -hélice se ha convertido en  $\beta$ -lámina (Figura 4.13). Esta transición se produce a una concentración de 14.7 mM de  $\text{MgCl}_2$ .



**Figura 4.13.** Representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina para diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ .

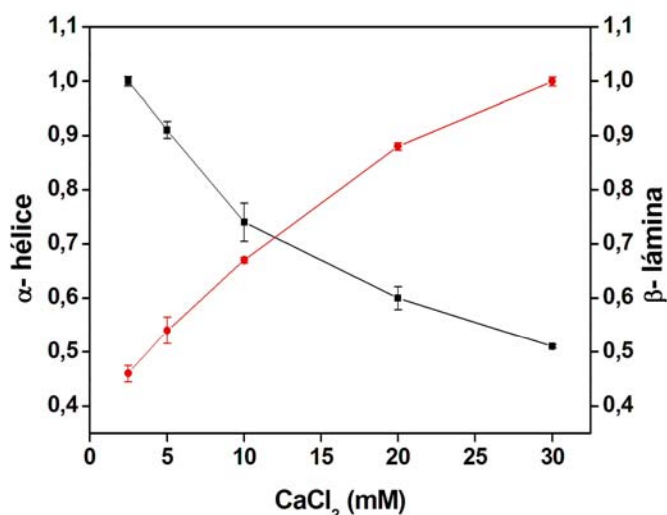
En los estudios con  $\text{CaCl}_2$ , se observa el mismo tipo de comportamiento, pero más gradual (Figura 4.14).



**Figura 4.14.** Espectros de DC de la ANT(6) a 25 °C en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y media de los porcentajes calculados para cada tipo estructural.  $\alpha$ =  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ =  $\beta$ -lámina, G= giros, D= estructura desordenada.

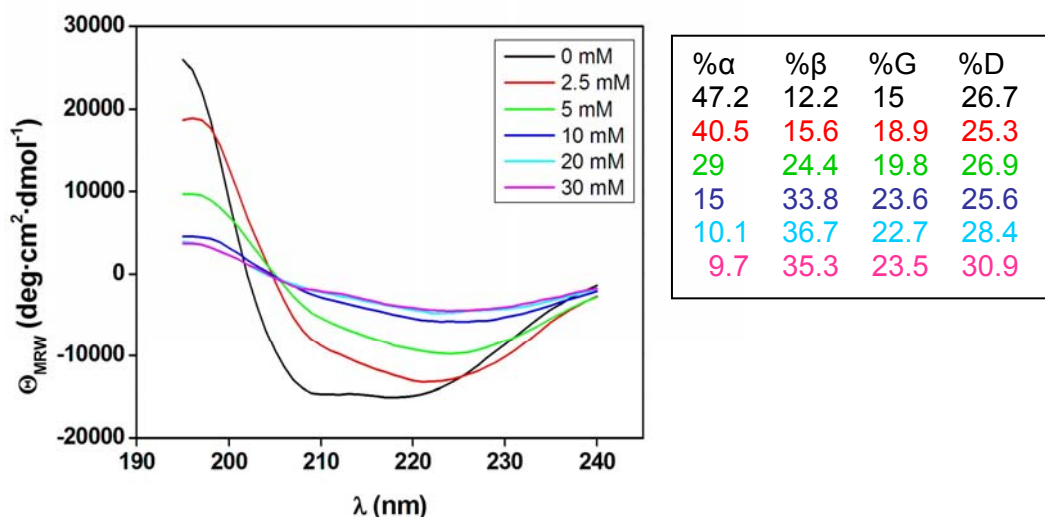
La transición de  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -lámina es más intensa que en el caso del  $\text{MgCl}_2$ , produciéndose una mayor pérdida de estructura de tipo  $\alpha$ -hélice. Así, el porcentaje de  $\alpha$ -hélice pasa de 47.2% en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , a 24.3% en presencia de una concentración de 30 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Del mismo modo, el porcentaje de  $\beta$ -lámina aumenta de un 12.2% a un 25.6% También podemos observar que la transición comienza a concentraciones más bajas del ión, a partir de una concentración de 2.5 mM. El porcentaje de giros también aumenta a medida que se eleva la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , pasando de un 15% en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , al 21.5% en presencia de una concentración de 30 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

En la representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y de  $\beta$ -lámina frente a la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , se determinó una concentración de 12.1 mM a la cual la mitad de la estructura de tipo  $\alpha$ -hélice se transforma en  $\beta$ -lámina (Figura 4.15). Así, a una concentración menor que la de  $\text{MgCl}_2$  obtenemos el mismo resultado, por lo que el calcio produce un efecto más desestabilizador que el magnesio.



**Figura 4.15.** Representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina para diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

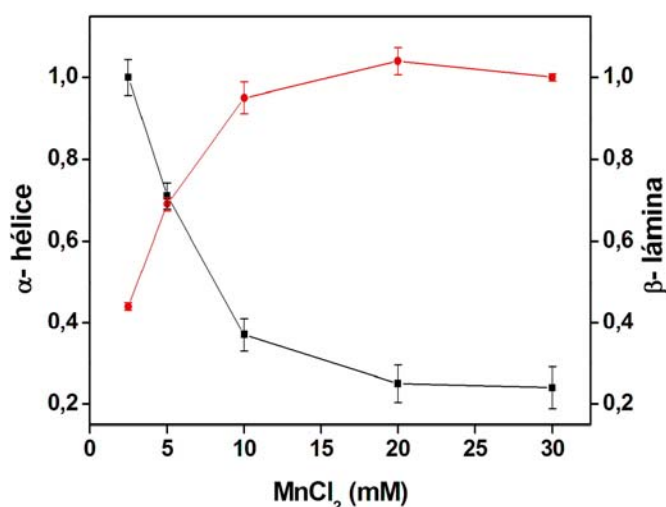
El efecto del ión  $\text{Mn}^{2+}$  sobre la estructura secundaria de la proteína es mucho más drástico que en los dos casos estudiados anteriormente, detectándose una gran pérdida de estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice (Figura 4.16).



**Figura 4.16.** Espectros de DC de la ANT(6) a 25 °C en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{MnCl}_2$  y media de los porcentajes calculados para cada tipo estructural.  $\alpha$ =  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ =  $\beta$ -lámina, G= giros, D= estructura desordenada.

Al representar la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y de  $\beta$ -lámina frente a la concentración de  $\text{MnCl}_2$ , obtenemos que a una concentración de 5.2 mM es cuando el 50% de  $\alpha$ -hélice ha pasado a  $\beta$ -lámina (Figura 4.17). Así, la

presencia del manganeso es la que causa el efecto más desestabilizador en la estructura secundaria de la ANT(6).



**Figura 4.17.** Representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina para diferentes concentraciones de  $\text{MnCl}_2$ .

#### - Estudio de la ANT(6) frente a temperatura.

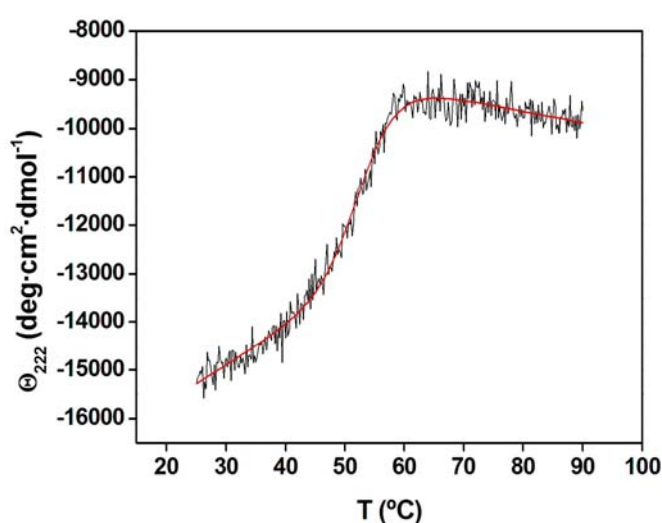
El efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de la ANT(6) se estudió por dicroísmo circular mediante dos tipos diferentes de experimentos: ensayos en el ultravioleta lejano a temperatura constante entre 25 y 80 °C y ensayos de desnaturalización térmica entre 25 y 90 °C. En éstos últimos se monitorizó el cambio de elipticidad a 222 nm por ser una de las longitudes de onda en las que se encuentra un mínimo característico de la estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice. Así mismo, ambos tipos de estudios se realizaron en ausencia y presencia de  $\text{MgCl}_2$ , para poder analizar si existe algún efecto sinérgico entre la acción de la temperatura y la presencia del cofactor.

#### Ensayos de desnaturalización.

La curva de desnaturalización térmica obtenida se puede analizar suponiendo un modelo de dos estados en el proceso de desnaturalización en el

que sólo se encuentran presentes un estado inicial (nativo) y un estado final (desnaturalizado) y que se ajusta a la ecuación 1 (Figura 4.18).

Este tipo de modelo se produce debido a la existencia de cooperatividad en el proceso de desplegamiento de la proteína —una vez que una molécula comienza a desplegarse se desencadena el desplegamiento rápido de todas las demás moléculas— y a la baja estabilidad de los intermedios de desplegamiento (Van Mierlo y Steensma, 2000). La ANT(6) presenta un comportamiento que se ajusta a este modelo de transición entre dos estados donde la  $T_M$  calculada fue de 53.1°C.

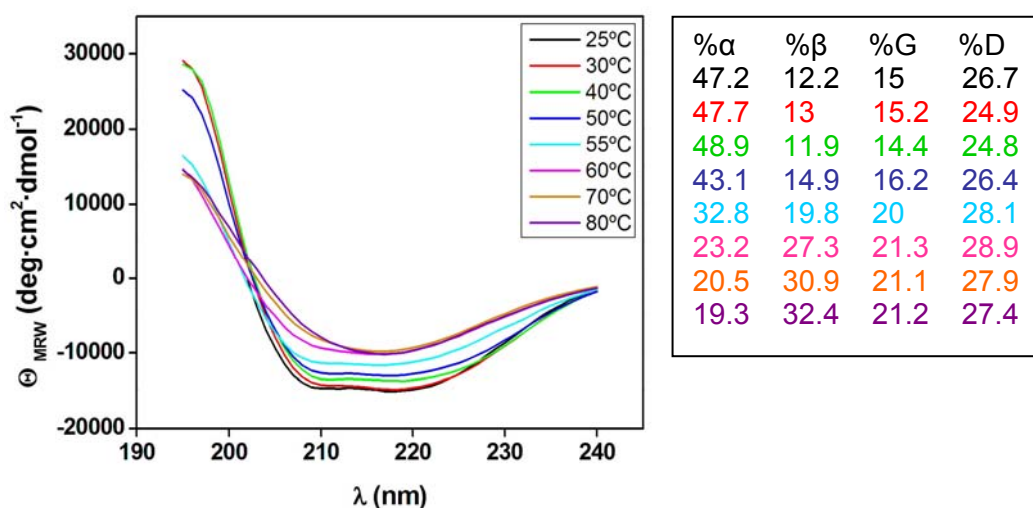


**Figura 4.18.** Ensayo de desnaturalización térmica de la ANT(6).

Una vez finalizado el ensayo no se procedió al enfriamiento de la muestra para ver la recuperación de la estructura, debido a que en la cubeta había una gran cantidad de proteína agregada.

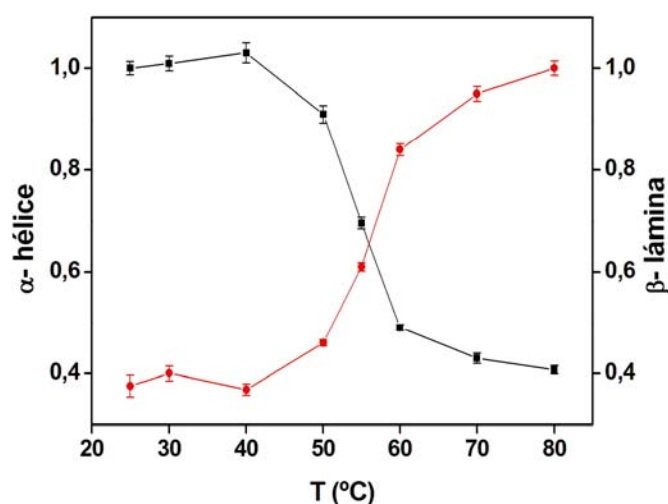
#### Ensayos en el ultravioleta lejano.

En los ensayos de la ANT(6) en el ultravioleta lejano, podemos observar cómo a temperaturas crecientes, se va produciendo una transición de estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -lámina (Figura 4.19). En ella pasamos de un 47.2% de  $\alpha$ -hélice a 25 °C, a un 19.3% a 80 °C; y de un 12.2% de  $\beta$ -lámina a 25 °C a un 32.4% a 80 °C.



**Figura 4.19.** Espectros de DC de la ANT(6) a diferentes temperaturas y media de los porcentajes calculados para cada tipo estructural. α= α-hélice, β= β-lámina, G= giros, D= estructura desordenada.

Por otro lado, la representación de la fracción molar de α-hélice y de β-lámina frente a la temperatura, nos permite determinar la temperatura a la cual la mitad de la estructura de tipo α-hélice se ha convertido en β-lámina, y que resultó ser 56 °C (Figura 4.20).



**Figura 4.20.** Representación de la fracción molar de α-hélice y β-lámina para diferentes temperaturas.

Esta temperatura de 56 °C obtenida para la ANT(6) es ligeramente superior a la hallada en el ensayo de desnaturalización, pero esto es debido a que ambos estudios tienen características diferentes. En los realizados en el

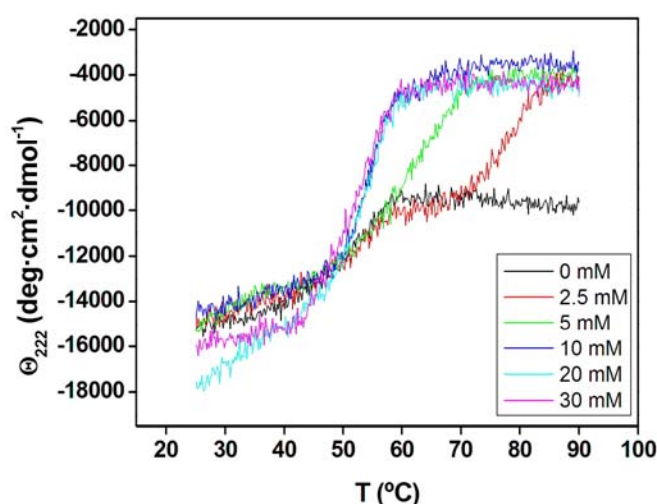
ultravioleta lejano, la muestra que se encuentra a temperatura ambiente se somete a aquella temperatura que hemos seleccionado en el equipo, la dejamos unos minutos y comenzamos a registrar el espectro de estructura secundaria. Sin embargo en los estudios de desnaturalización, la muestra de proteína está sometida a un aumento de la temperatura a una velocidad constante, en la que no se permite que la muestra alcance el equilibrio en cada temperatura en la que se registra la señal. Así, en ambos tipos de ensayos partimos de una población de proteína que se encuentra en diferentes situaciones de equilibrio a la temperatura de registro.

No existen datos de la termoestabilidad de la ANT(6) de *Corynebacterium acetoacidophilum* ni de la de *Bacillus subtilis* estudiada por Kono y colaboradores, aunque en este último caso se apunta que la temperatura óptima para la actividad del enzima es de 35 °C (Kono *et al.*, 1987). En el caso de la ANT(2'')-la de *Pseudomonas aeruginosa*, se llevó a cabo un estudio por dicroísmo circular de la desnaturalización térmica del enzima (Wright y Serpersu, 2005). Los autores señalan una temperatura de 32 °C a la cual el enzima comienza a perder parte de su estructura secundaria, con una  $T_M$  de 45 °C.

#### Ensayos de desnaturalización en presencia de $MgCl_2$ .

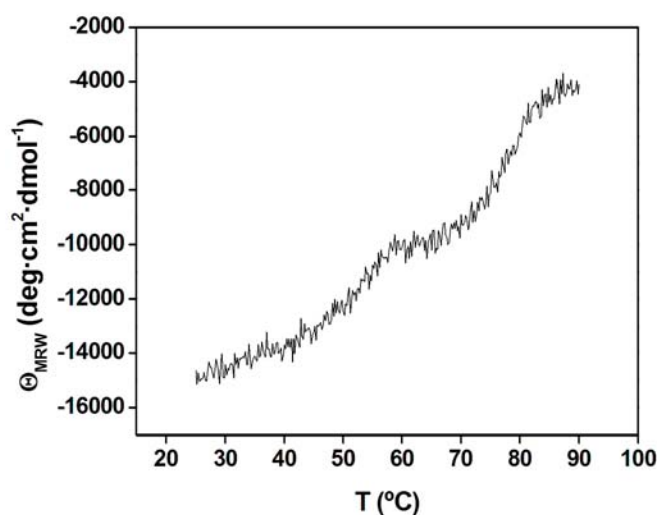
En los ensayos de desnaturalización en presencia de concentraciones crecientes de  $MgCl_2$  observamos que la proteína se comportaba de forma diferente a como lo hacía en ausencia del cofactor (Figura 4.21).





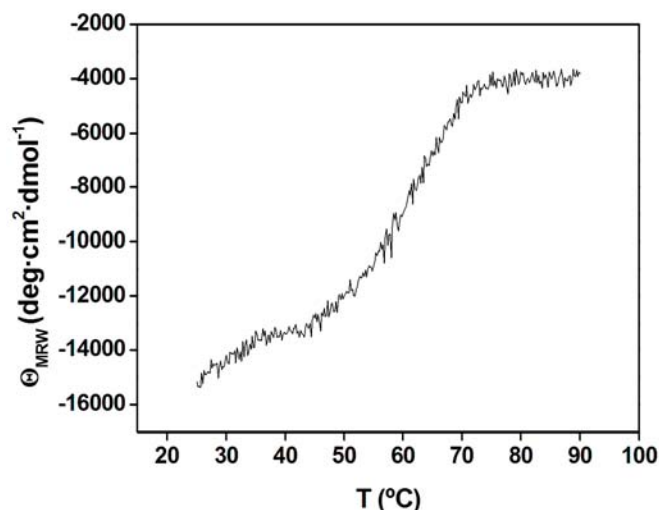
**Figura 4.21.** Ensayos de desnaturalización térmica de la ANT(6) a diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ .

A una concentración de 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$  en el medio, obtenemos que los datos no se ajustan a una desnaturalización entre dos estados con una única transición. (Figura 4.22). En este caso, podríamos estar detectando un intermedio parcialmente desnaturalizado, además de la proteína en su estado nativo inicial y en su estado desnaturalizado final. La naturaleza del intermedio detectado no está clara, pero podría estar relacionada con algún dominio de la proteína que se desnaturalizase en primer lugar.



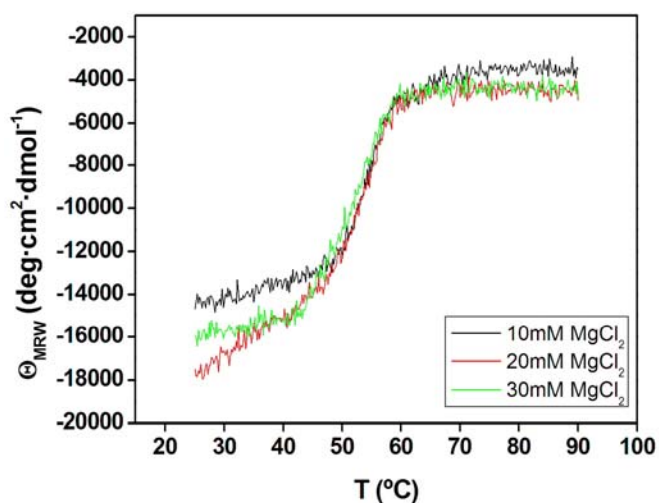
**Figura 4.22.** Ensayo de desnaturalización térmica de la ANT(6) en presencia de 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

En el caso del ensayo de desnaturalización con 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , observamos que también se da una transición entre varios estados como en el anterior ensayo, pero la primera de ellas es mucho menos marcada (Figura 4.23). Podría ser que esta primera transición se debiese a una desestructuración en una zona más sensible de la proteína.



**Figura 4.23.** Ensayo de desnaturalización térmica de la ANT(6) en presencia de 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

En los ensayos a concentraciones de 10, 20 y 30 mM de  $\text{MgCl}_2$ , volvemos a obtener una curva de desnaturalización entre dos estados y una  $T_M$  muy similar a la de la ANT(6) en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 4.24).



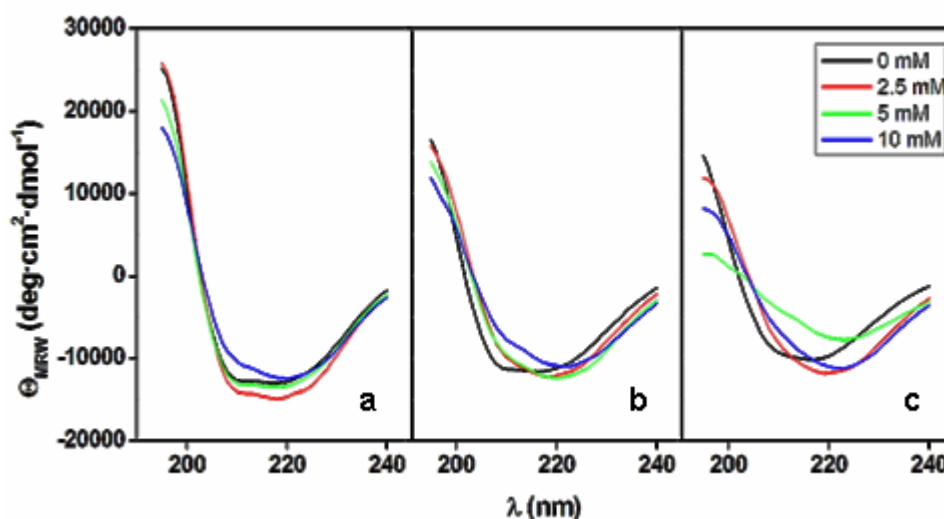
**Figura 4.24.** Ensayo de desnaturalización térmica de la ANT(6) en presencia de 10, 20 y 30 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

Así, en el ensayo con una concentración de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  obtenemos una  $T_M$  de 54.5 °C, en presencia de 20 mM de  $\text{MgCl}_2$  una  $T_M$  de 54.6 °C y a 30 mM de  $\text{MgCl}_2$  una  $T_M$  de 52.1 °C.

#### Ensayos en el ultravioleta lejano en presencia de $\text{MgCl}_2$ .

Para evaluar en más detalle el efecto de la presencia conjunta de temperatura y magnesio, realizamos ensayos en el ultravioleta lejano. Elegimos un rango de temperaturas entre 50 y 60 °C, ya que es en esta franja en la que se produce la desnaturalización de la proteína, y unas concentraciones de 2.5, 5 y 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , ya que a partir de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  no se observaron cambios significativos en el comportamiento del enzima en los ensayos de desnaturalización.

En los espectros obtenidos podemos observar que a medida que aumenta la temperatura, el efecto de la concentración de  $\text{MgCl}_2$  es mayor (Figura 4.25).



**Figura 4.25.** Espectros de DC de la ANT(6) a diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y temperaturas: a) 50 °C, b) 55 °C, y c) 60 °C.

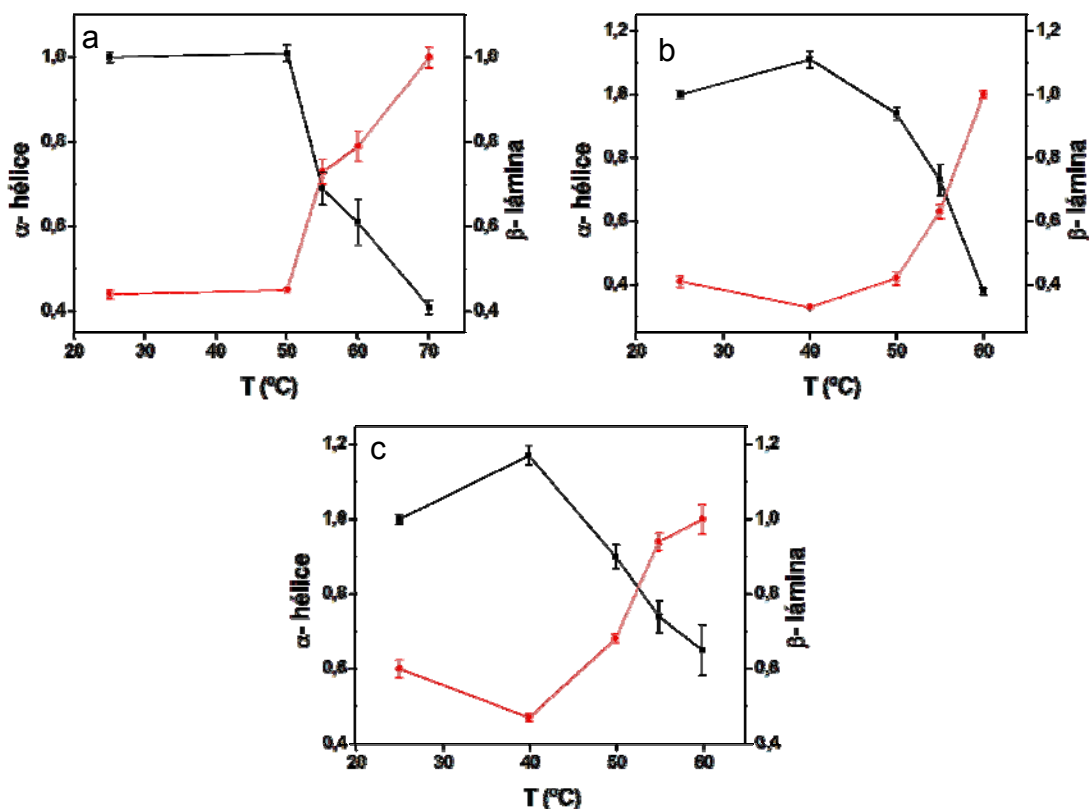
Sin embargo, esta situación no se ve reflejada en los datos obtenidos por el cálculo de los tres programas informáticos que integran CDPPro (Tabla 4.3). En el estudio realizado a 50 °C podemos ver que a una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 2.5 mM, la proporción de  $\alpha$ -hélice aumenta, mientras que a 5 mM existe casi el mismo porcentaje que en ausencia de magnesio y que a 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  hay

una pérdida de un 5% de  $\alpha$ -hélice (Tabla 4.3). A 55 °C la presencia de  $\text{MgCl}_2$  no parece ejercer ningún efecto significativo en la estructura secundaria de la proteína, ya que apenas existe variación en los porcentajes obtenidos para cada tipo estructural (Tabla 4.3). En los ensayos realizados a 60 °C existe un aumento en la proporción de  $\alpha$ -hélice, excepto en el ensayo efectuado en presencia de 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  en el que existe un porcentaje de  $\alpha$ -hélice inferior al esperado en vista de los otros resultados, y que pudiera ser debido a un error en la preparación de la muestra o en el registro del ensayo (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Medias y desviaciones estándar de los porcentajes obtenidos para cada tipo estructural en cada una de las condiciones ensayadas.

		0 mM $\text{MgCl}_2$	2.5 mM $\text{MgCl}_2$	5 mM $\text{MgCl}_2$	10 mM $\text{MgCl}_2$
T= 50 °C	% $\alpha$ -hélice	43.1 $\pm$ 1.7	48.1 $\pm$ 1.9	43.9 $\pm$ 1.9	38.1 $\pm$ 3.2
	% $\beta$ -lámina	14.9 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.1	12.7 $\pm$ 2.2	15.7 $\pm$ 1.3
	% Giros	16.2 $\pm$ 0.4	16 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 0.9	19.9 $\pm$ 2.7
	% Desordenada	26.4 $\pm$ 1.3	25.1 $\pm$ 1.4	26.6 $\pm$ 1.7	26.8 $\pm$ 1.3
T= 55 °C	% $\alpha$ -hélice	32.8 $\pm$ 1.1	33.0 $\pm$ 3.8	34 $\pm$ 5.0	31.5 $\pm$ 4.3
	% $\beta$ -lámina	19.8 $\pm$ 0.8	19.4 $\pm$ 3.0	19.1 $\pm$ 2.2	21.6 $\pm$ 2.3
	% Giros	20 $\pm$ 1.2	20.5 $\pm$ 1.4	20.8 $\pm$ 3.0	20.3 $\pm$ 2.7
	% Desordenada	28.1 $\pm$ 0.9	27.3 $\pm$ 0.9	26.9 $\pm$ 1.7	26.6 $\pm$ 1.7
T= 60 °C	% $\alpha$ -hélice	23.2 $\pm$ 0.6	29.3 $\pm$ 5.4	17.7 $\pm$ 1.1	27.5 $\pm$ 6.8
	% $\beta$ -lámina	27.3 $\pm$ 1.2	20.1 $\pm$ 3.6	30.3 $\pm$ 1.2	22.9 $\pm$ 4.0
	% Giros	21.3 $\pm$ 0.4	22.2 $\pm$ 1.7	22.8 $\pm$ 1.2	22 $\pm$ 5.3
	% Desordenada	28.9 $\pm$ 1.2	27.2 $\pm$ 1.1	29.2 $\pm$ 1.7	27.6 $\pm$ 3.2

La representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y de  $\beta$ -lámina frente a la temperatura para cada una de las concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  ensayadas nos permite determinar la temperatura a la cual la mitad de la estructura de tipo  $\alpha$ -hélice se ha convertido en  $\beta$ -lámina. En el caso del estudio a 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$  esta temperatura es de 54.7 °C, para 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  es de 55.7 °C y para 10 mM, 52.6 °C (Figura 4.26). Todas estas temperaturas son muy similares a la obtenida con el mismo tipo de representación frente a la temperatura y en ausencia de  $\text{MgCl}_2$  (56 °C), excepto en el caso de la presencia de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  en el que si que parece que existe un efecto significativo de la presencia conjunta de temperatura y  $\text{MgCl}_2$ .



**Figura 4.26.** Representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina para diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y temperaturas: a) 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , b) 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , y c) 10 mM  $\text{MgCl}_2$ .

La disparidad de los datos obtenidos en los ensayos en presencia de  $\text{MgCl}_2$  y temperatura con cada programa informático, se ve reflejada en los altos valores de desviación estándar en comparación con los valores obtenidos en las mismas condiciones pero en ausencia de ión divalente (Tabla 4.3). Por ello, nos planteamos que el comportamiento detectado en estas condiciones de ensayo podría ser debido a una agregación de la proteína.

#### - Estudio de autoagregación.

Realizamos ensayos de autoagregación de la ANT(6) en presencia de  $\text{MgCl}_2$  y temperatura con el fin de averiguar si la proteína agregaba en las condiciones de ensayo que habíamos utilizado en los estudios de dicroísmo circular (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Resultados de los ensayos de autoagregación de la ANT(6) a diferentes temperaturas y concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ .

	<b>[MgCl<sub>2</sub>] (mM)</b>	<b><math>\Delta\text{Abs}_{400}</math> (mUA)</b>	<b><math>V_{\text{agregación}}</math> (mUA·min<sup>-1</sup>)</b>
<b>T= 25 °C</b>	2.5	0.0035	$0.2 \cdot 10^{-3}$
	10	0.007	$0.5 \cdot 10^{-3}$
	30	0.138	$9.2 \cdot 10^{-3}$
<b>T= 45 °C</b>	2.5	0.027	$1.8 \cdot 10^{-3}$
	10	0.064	$4.3 \cdot 10^{-3}$
	30	0.108	$7.2 \cdot 10^{-3}$

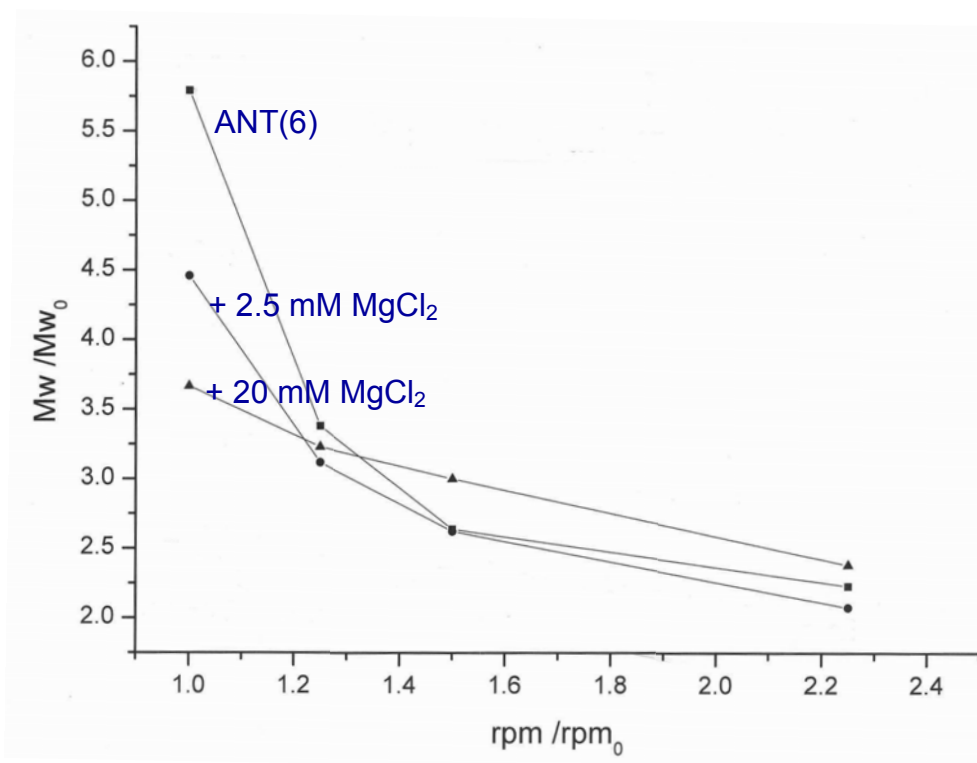
Los resultados nos muestran que a 25 °C y en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{MgCl}_2$ , se da un aumento en el incremento de absorbancia a 400 nm y de la velocidad a la que agrega la muestra. Esta situación se ve incentivada a 45 °C.

Así, la ANT(6) agrega a medida que aumenta la temperatura y la concentración de  $\text{MgCl}_2$  en el medio.

#### **- Estudio de ultracentrifugación.**

Dado que los estudios de equilibrio de sedimentación permiten determinar la masa molecular de las especies macromoleculares que sedimentan en cada caso, y si existen agregados en la muestra de proteína, abordamos el estudio de la ANT(6) tanto en ausencia como en presencia de  $\text{MgCl}_2$ .

Los resultados obtenidos se correspondían con un comportamiento típico en el que existen fenómenos de agregación (Figura 4.27).



**Figura 4.27.** Ensayo de equilibrio de sedimentación de la ANT(6) a diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ .  $M_w$ = Masa molecular aparente;  $M_{w0}$ =Masa molecular del monómero.

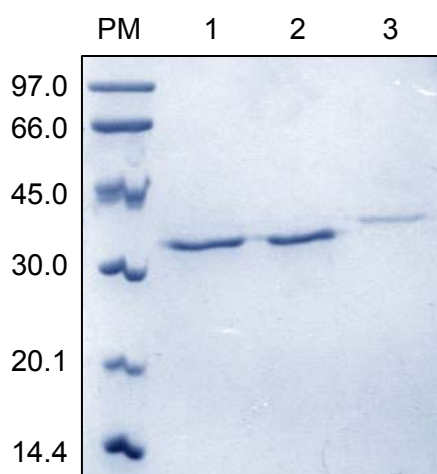
Así, la muestra de ANT(6) se comporta como una mezcla heterogénea de agregados de aproximadamente 6 miembros hasta agregados que tienden a comportarse como un dímero. Cuando incluimos  $\text{Mg}^{2+}$  en el experimento, aunque el comportamiento general se mantenía —las muestras continuaban comportándose como mezclas heterogéneas de agregados—, el análisis más detallado revelaba diferencias significativas. Así, el  $\text{Mg}^{2+}$  provoca una disminución en el tamaño máximo de los agregados que es inversamente proporcional a la concentración del ión.

Analizando en conjunto los datos obtenidos de los estudios de DC y ultracentrifugación, los resultados sugieren que, al menos, parte del efecto observado del  $\text{Mg}^{2+}$  en la estructura de la ANT(6) podría estar relacionado con el equilibrio de agregación-disgregación. Los resultados de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano obtenidos para la ANT(6) en presencia de magnesio y de temperatura, podrían deberse a la existencia de proteína agregada en la muestra.

### - Estudio de ANT(6) sin cola de histidinas [ANT(6) $\Delta$ His].

Los resultados expuestos anteriormente indicaban que la ANT(6) recombinante presentaba una clara tendencia a la agregación y que ésta podría explicar algunos de los resultados obtenidos en los ensayos de dicroísmo circular. Debido a que la presencia de la cola de histidinas en proteínas recombinantes puede jugar un papel crítico en el plegamiento correcto de la proteína, decidimos evaluar el comportamiento del enzima sin el fragmento de histidinas con el fin de comprobar si esta predisposición a la agregación era debida a la presencia de la cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína.

Para llevar a cabo este estudio, el primer paso fue la eliminación de la cola de histidinas de la proteína. El plásmido de expresión pET-28b(+) posee en su secuencia un sitio de corte por trombina, que es la secuencia de aminoácidos: Leu·Val·Pro·Arg·Gly·Ser (Chang *et al.*, 1985). La trombina corta el enlace entre la arginina y la glicina, liberándose el fragmento deseado. El análisis por SDS-PAGE de la ANT(6) sometida a la acción de la trombina nos mostró una proteína del tamaño esperado (Figura 4.28).



**Figura 4.28.** Gel SDS-PAGE al 13% de la eliminación del fragmento de histidinas por corte con trombina. PM= Patrón de pesos moleculares en kDa; 1y 2= ANT(6) sometida a digestión con trombina; 3= ANT(6) sin cortar.

Los parámetros teóricos calculados a partir de la secuencia de aminoácidos de la ANT(6) $\Delta$ His, cambian ligeramente con respecto a la ANT(6) recombinante. El coeficiente de extinción molar a 280 nm —64390 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>— se mantiene prácticamente invariable. En el punto isoelectrico se observa un



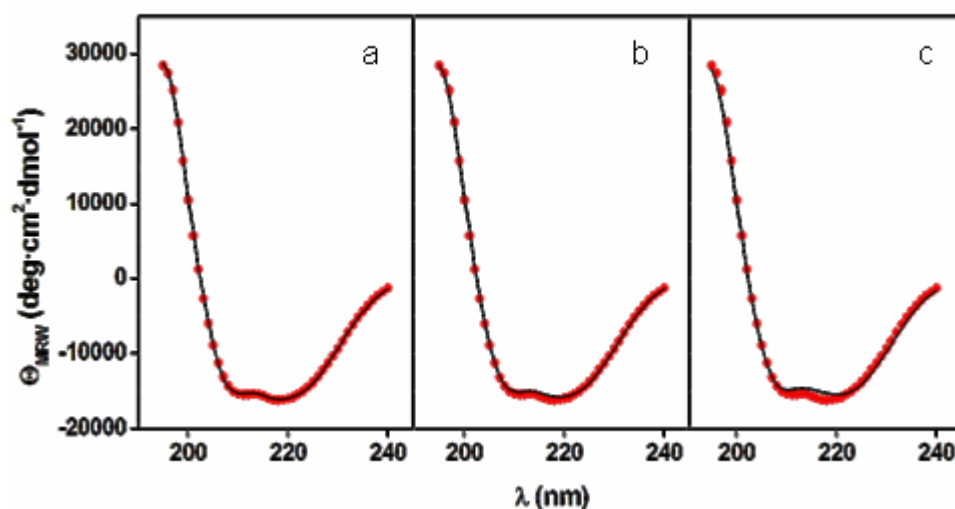
descenso de aproximadamente 0.5 puntos hasta un valor de 5.08 frente al 5.65 que presenta la proteína con la cola de histidinas, y el peso molecular disminuye a los 35539.4 Da.

El cálculo de concentración de proteína en todos los ensayos realizados con la ANT(6) $\Delta$ His, se efectuó utilizando el coeficiente de extinción molar obtenido experimentalmente para la ANT(6) ( $\epsilon^{280} = 99374.9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), ya que al mantenerse los coeficientes teóricos de ambas muy similares, podemos presuponer que los experimentales también lo serían.

Al analizar el comportamiento cinético de la ANT(6) $\Delta$ His, obtuvimos una eficacia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) para el sustrato ATP de  $1.9 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ , que fue prácticamente igual a la obtenida en las mismas condiciones con la ANT(6), tal como se detallará más adelante.

#### Análisis de la estructura secundaria. Dicroísmo Circular.

Los espectros de la ANT(6) $\Delta$ His en el ultravioleta lejano presentan también un comportamiento característico de  $\alpha$ -hélice, con dos mínimos en la señal a  $\sim 208 \text{ nm}$  y  $\sim 222 \text{ nm}$  y un máximo a  $\sim 192 \text{ nm}$  (Figura 4.29).



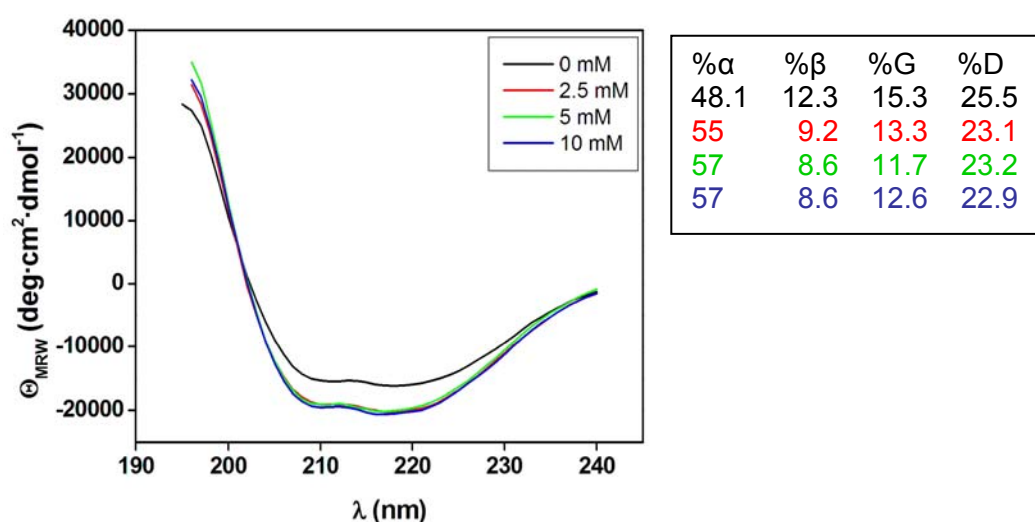
**Figura 4.29.** Espectros de DC a 25 °C de la ANT(6) $\Delta$ His. Los puntos rojos representan los datos experimentales y la línea continua los ajustes de los espectros teóricos calculados con los programas informáticos: a) CONTIN, b) CDSSTR, y c) SELCON3.

El cálculo de la contribución de los distintos tipos de estructura secundaria dio un 48.1% de  $\alpha$ -hélice, muy similar al porcentaje obtenido para la ANT(6) (47.2%) (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Porcentaje de cada elemento estructural calculado con los tres programas informáticos con su correspondiente media y desviación estándar.

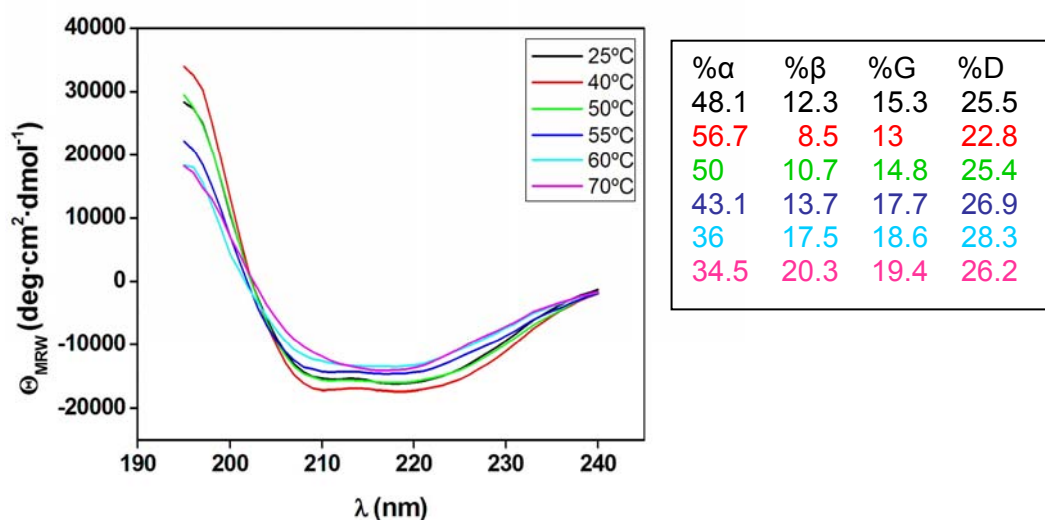
	CONTIN	CDSSTR	SELCON3	$\bar{x} \pm \sigma$
% $\alpha$ -hélice	47.2	47.5	49.6	48.1 $\pm$ 1.3
% $\beta$ -lámina	10.2	15.6	11.2	12.3 $\pm$ 2.9
% Giros	15.3	14.6	16.1	15.3 $\pm$ 0.7
% Desordenada	27.3	22.5	26.7	25.5 $\pm$ 2.6

A continuación, realizamos estudios de estructura secundaria en presencia de magnesio. Aquí sí observamos un comportamiento claramente distinto con respecto a la proteína que mantenía la cola de histidinas. A concentraciones crecientes de dicho cofactor, no se observó la transición de  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -lámina que obtuvimos en los ensayos de la ANT(6) si no que, además, el porcentaje de  $\alpha$ -hélice aumenta de un 48.1% a un 57% en presencia de 10 mM de  $MgCl_2$ , mientras que el porcentaje de  $\beta$ -lámina disminuye en un 3.7% (Figura 4.30).



**Figura 4.30.** Espectros de DC de la ANT(6) $\Delta$ His a 25 °C en presencia de diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  y media de los porcentajes calculados para cada tipo estructural.  $\alpha$ =  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ =  $\beta$ -lámina, G= giros, D= estructura desordenada.

Seguidamente, estudiamos el comportamiento la ANT(6) $\Delta$ His frente a la temperatura a través de ensayos en el ultravioleta lejano (Figura 4.31).

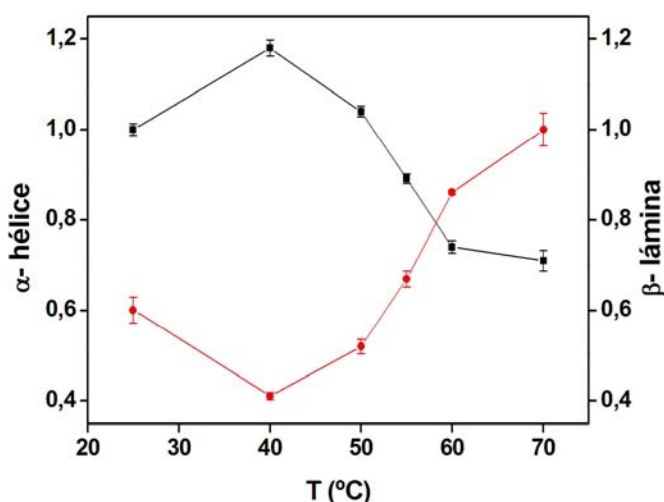


**Figura 4.31.** Espectros de DC de la ANT(6) $\Delta$ His a diferentes temperaturas y media de los porcentajes calculados para cada tipo estructural.  $\alpha$ =  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ =  $\beta$ -lámina, G= giros, D= estructura desordenada.

En ellos podemos observar cómo a temperaturas crecientes, se va produciendo una transición de estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -lámina. Así, pasamos de un 48.1% de  $\alpha$ -hélice a 25 °C, a un 34.5% a 70 °C; y de un 12.3% de  $\beta$ -lámina a 25 °C a un 20.3% a 70 °C.

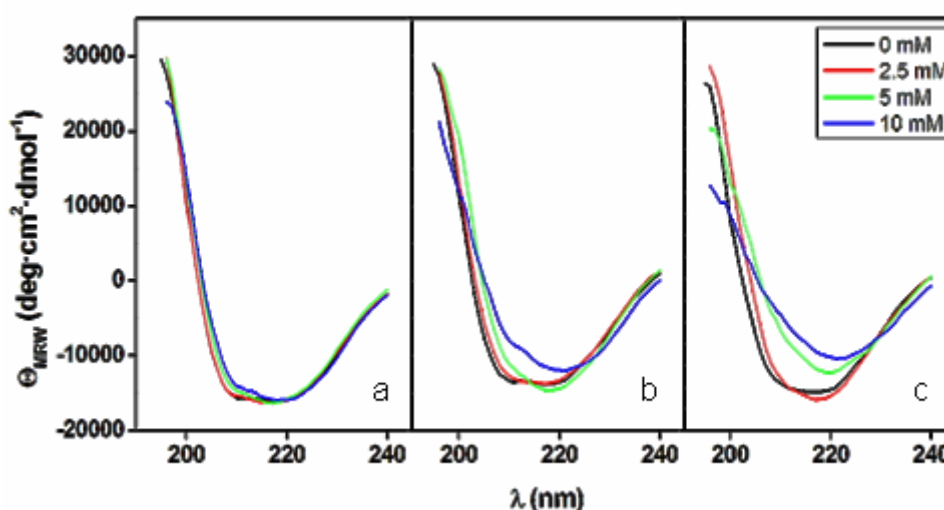
La representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y de  $\beta$ -lámina frente a la temperatura, nos permite determinar la temperatura a la cual la mitad de la estructura  $\alpha$ -hélice se ha convertido en  $\beta$ -lámina, siendo esta temperatura de 58.2 °C (Figura 4.32).

Esta temperatura es ligeramente superior a la calculada de la misma manera para la ANT(6) que es de 56 °C, por lo que podríamos pensar que la ANT(6)  $\Delta$ His es ligeramente más termoestable que la ANT(6).



**Figura 4.32.** Representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina para diferentes temperaturas.

Por último, llevamos a cabo el estudio del efecto conjunto de la presencia de magnesio y temperatura. Para ello realizamos ensayos en el ultravioleta lejano en las mismas condiciones que se habían usado para la ANT(6). Observamos que se da una transición de  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -lámina y que existe un efecto mayor de la concentración de  $\text{MgCl}_2$  a medida que aumentamos la temperatura (Figura 4.33).



**Figura 4.33.** Espectros de DC de la ANT(6) $\Delta$ His a diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y temperaturas: a) 50 °C, b) 55 °C, y c) 60 °C.

En este caso los espectros obtenidos para cada ensayo se corresponden con los porcentajes hallados con cada programa de cálculo, que además tienen

un resultado muy similar tal como lo refleja el valor de desviación estándar (Tabla 4.6).

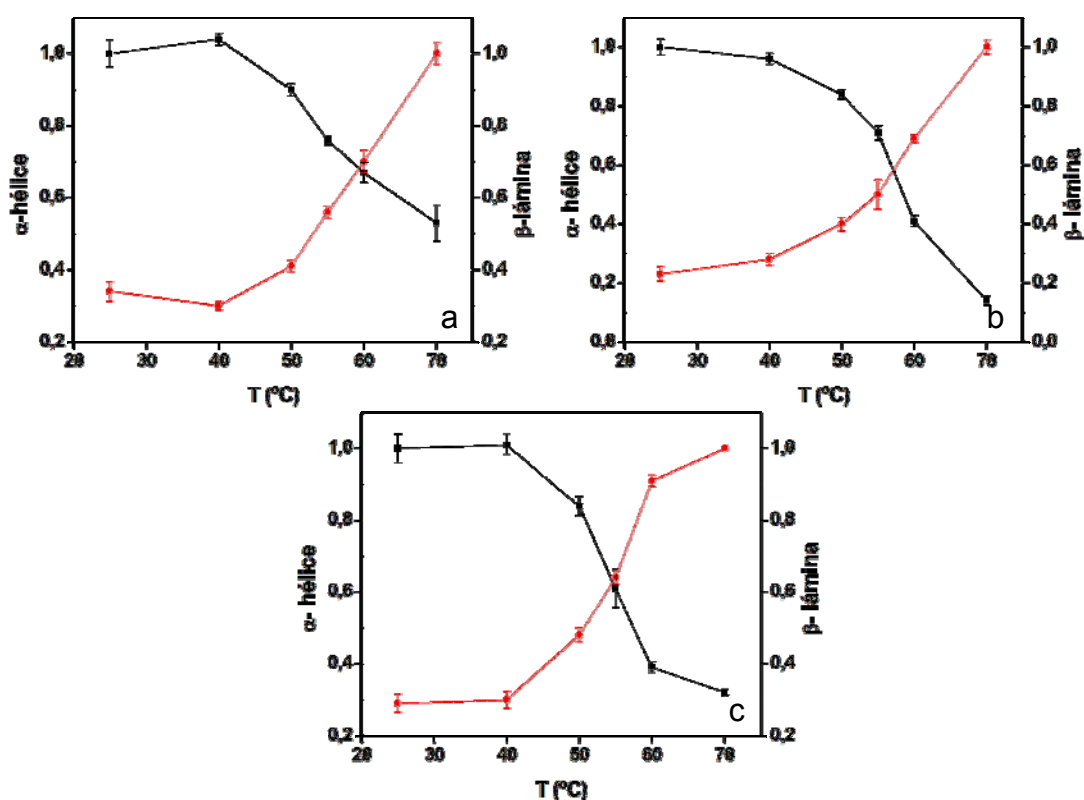
A 50 °C podemos ver que a una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 2.5 mM la proporción de  $\alpha$ -hélice permanece prácticamente igual que en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , y a 5 y 10 mM existe una pérdida de un 2% de  $\alpha$ -hélice, por lo que la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  no tiene prácticamente efecto a 50 °C (Tabla 4.6). En los ensayos efectuados a 55 °C detectamos un efecto desestabilizador debido al  $\text{Mg}^{2+}$ , ya que a concentraciones crecientes podemos observar cómo el porcentaje de  $\alpha$ -hélice va disminuyendo significativamente, a la vez que aumenta el de  $\beta$ -lámina (Tabla 4.6). Así, la proporción de  $\alpha$ -hélice pasa de un 43.1% a 55 °C en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  a un 35.1% en presencia de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ . En las mismas condiciones, la  $\beta$ -lámina pasa de un 13.6% a un 18.7%. Por último, en los estudios a 60 °C también se da una sucesiva disminución del porcentaje de  $\alpha$ -hélice y un aumento del de la  $\beta$ -lámina (Tabla 4.6). La  $\alpha$ -hélice pasa de un 36% en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  a un 22.2% en presencia de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ . En las mismas condiciones, la  $\beta$ -lámina pasa de un 17.5% a un 26.5%.

**Tabla 4.6.** Medias y desviaciones estándar de los porcentajes obtenidos para cada tipo estructural en cada una de las condiciones ensayadas.

		0 mM $\text{MgCl}_2$	2.5 mM $\text{MgCl}_2$	5 mM $\text{MgCl}_2$	10 mM $\text{MgCl}_2$
<b>T= 50 °C</b>	<b>% <math>\alpha</math>-hélice</b>	50 $\pm$ 1.2	49.8 $\pm$ 1.7	47.9 $\pm$ 1.6	48.1 $\pm$ 2.6
	<b>% <math>\beta</math>-lámina</b>	10.7 $\pm$ 1.6	11.1 $\pm$ 1.7	14.7 $\pm$ 2.2	13.9 $\pm$ 2.1
	<b>% Giros</b>	14.8 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 0.9	14.9 $\pm$ 0.5	16.5 $\pm$ 1.5
	<b>% Desordenada</b>	25.4 $\pm$ 2.1	25.4 $\pm$ 1.9	23.9 $\pm$ 1.9	22.7 $\pm$ 3.2
<b>T= 55 °C</b>	<b>% <math>\alpha</math>-hélice</b>	43.1 $\pm$ 1.0	41.8 $\pm$ 1.3	40.8 $\pm$ 2.4	35.1 $\pm$ 5.3
	<b>% <math>\beta</math>-lámina</b>	13.6 $\pm$ 1.7	15.2 $\pm$ 1.7	18.5 $\pm$ 4.9	18.7 $\pm$ 1.8
	<b>% Giros</b>	17.7 $\pm$ 0.7	16.8 $\pm$ 0.8	17 $\pm$ 0.3	19.9 $\pm$ 3.0
	<b>% Desordenada</b>	26.9 $\pm$ 1.2	26.6 $\pm$ 0.8	24.2 $\pm$ 3.2	26.4 $\pm$ 2.1
<b>T= 60 °C</b>	<b>% <math>\alpha</math>-hélice</b>	36 $\pm$ 1.4	37.2 $\pm$ 2.7	23.4 $\pm$ 1.8	22.2 $\pm$ 1.5
	<b>% <math>\beta</math>-lámina</b>	17.5 $\pm$ 0.6	19 $\pm$ 3.3	25.2 $\pm$ 1.1	26.5 $\pm$ 1.5
	<b>% Giros</b>	18.6 $\pm$ 0.6	18.1 $\pm$ 0.7	23.4 $\pm$ 0.8	22.1 $\pm$ 2.1
	<b>% Desordenada</b>	28.3 $\pm$ 0.5	26.3 $\pm$ 1.1	29 $\pm$ 1.1	28.9 $\pm$ 1.3

Al representar la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y de  $\beta$ -lámina frente a la temperatura para cada una de las concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ , encontramos que

las temperaturas a las cuales la mitad de la estructura tipo  $\alpha$ -hélice se ha convertido en  $\beta$ -lámina son muy similares a la hallada frente a la temperatura en ausencia de magnesio (58.2 °C), excepto en el caso de la presencia de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  en el que si que parece que existe un efecto significativo de la presencia conjunta de temperatura y  $\text{MgCl}_2$ . Las temperaturas obtenidas fueron: 59.4 °C en los ensayos a 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 57.1 °C en presencia de 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 54.6 °C en presencia de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Figura 4.34).

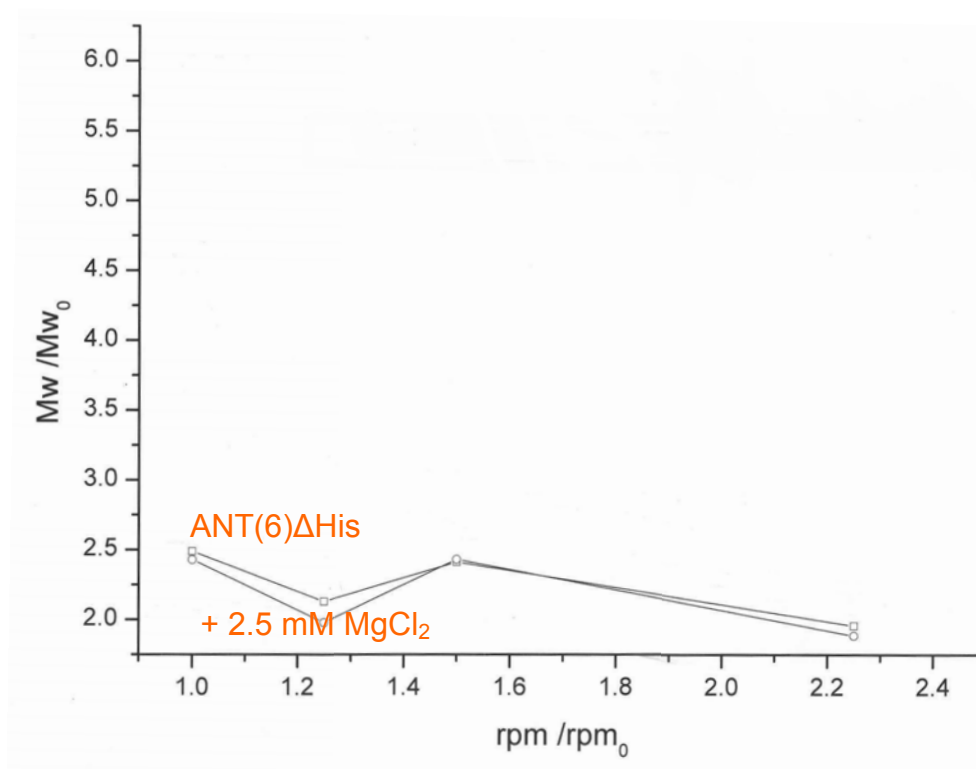


**Figura 4.34.** Representación de la fracción molar de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina para diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y temperaturas: a) 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , b) 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , y c) 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

#### Estudio de ultracentrifugación.

Con el fin de comprobar que el comportamiento detectado de la ANT(6) $\Delta$ His en los estudios de DC era debido a la presencia de los diferentes factores ensayados ( $\text{MgCl}_2$  y temperatura) y no a la existencia de agregados en la muestra, llevamos a cabo un ensayo de equilibrio de sedimentación en ausencia y presencia de  $\text{MgCl}_2$ .

En el ensayo, detectamos un comportamiento claramente diferente al eliminar el fragmento de histidinas de la proteína. En este caso la proteína se comporta prácticamente como un dímero sin que se detecten la presencia de agregados tal como sucedía en el caso de la ANT(6). Por otra parte, no se observan diferencias en el comportamiento de la ANT(6) $\Delta$ His en presencia o ausencia de  $\text{MgCl}_2$  (Figura 4.35).



**Figura 4.35.** Ensayo de equilibrio de sedimentación de la ANT(6) $\Delta$ His en ausencia y en presencia de 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Mw= Masa molecular aparente; Mw<sub>0</sub>=Masa molecular del monómero.

A la vista de los resultados obtenidos por ultracentrifugación, el comportamiento que hemos detectado de la ANT(6) $\Delta$ His no obedece a la presencia de agregados macromoleculares.

#### - Modelización molecular de la ANT(6).

La elucidación de la estructura tridimensional de proteínas es de suma importancia no sólo en el diseño de nuevos fármacos, sino que permite conocer

a nivel molecular las interacciones entre proteínas, su mecanismo de acción y la relación entre estructura y propiedades funcionales.

En cuanto a las diferentes familias de enzimas que modifican los antibióticos aminoglicósidos, la menos conocida estructuralmente es la familia de las adeniltransferasas, ya que en el momento de la realización de este trabajo sólo se conocía la estructura tridimensional de uno de sus enzimas, la ANT(4') de *Staphylococcus aureus* (número de acceso del PDB: 1KNY). Por todo ello, el conocimiento de la estructura tridimensional de la ANT(6) podría ser de gran utilidad para el diseño de inhibidores de este enzima.

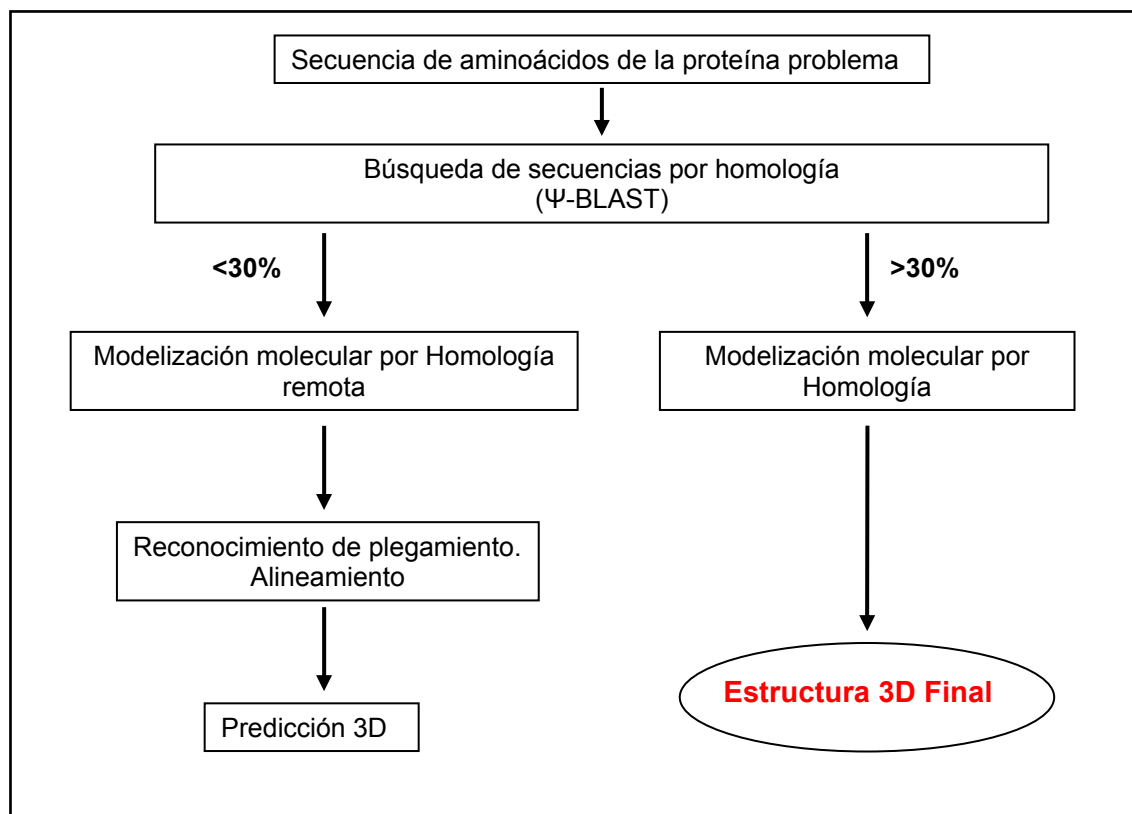
Teniendo en cuenta que hemos sido capaces de clonar, sobre-expresar y purificar el enzima en gran cantidad y con un alto grado de pureza, nos planteamos realizar una colaboración con el grupo de la Dra. Isabel Usón del Instituto de Biología Molecular de Barcelona del CSIC para llevar a cabo su posible cristalización. Paralelamente y debido a la dificultad encontrada en la obtención de cristales de la proteína, nos propusimos la construcción de un modelo tridimensional para este enzima mediante modelización por homología, en colaboración con la Dra. Nuria Campillo del Instituto de Química Médica del CSIC.

En este apartado se describe la búsqueda de un patrón estructural, así como la construcción de un modelo tridimensional de la ANT(6) mediante modelado por homología.

### 1. Búsqueda de homólogos tridimensionales.

La idea elemental de la que surge la modelización por homología se basa en el hecho de que todas las parejas de proteínas que presentan una homología mayor al 30% tienen estructura tridimensional similar (Sander y Schneider, 1991). De este modo se puede construir el modelo tridimensional de una proteína de estructura desconocida, partiendo de la semejanza de secuencia con proteínas de estructura conocida (Blundell *et al.*, 1987). En caso de no presentar estas características se buscan homólogos remotos, tal como se detallará a continuación (Figura 4.36).





**Figura 4.36.** Esquema de la predicción computacional de la estructura tridimensional de una proteína.

La búsqueda de proteínas homólogas a ANT(6) con estructura tridimensional conocida se realizó empleando el programa Ψ-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Este programa compara una secuencia problema con una base de datos de proteínas de forma iterativa hasta encontrar todos los homólogos de la secuencia problema con estructura tridimensional conocida o desconocida. Desafortunadamente, la búsqueda realizada con la secuencia de la ANT(6) no generó ninguna proteína homóloga con estructura tridimensional conocida.

## 2. Búsqueda de homólogos remotos (Reconocimiento del plegamiento o “threading”).

Cuando no se encuentran homólogos para la secuencia diana y los porcentajes de identidad que se obtienen son demasiado bajos (inferiores al 30%), no es posible realizar un buen alineamiento entre la secuencia problema

### 2.1-Predicción de la estructura secundaria de la ANT(6).

ANT6	MRSEQEMMDIFLDFALNDERIRLVTLGSRTRNRIPPDNFQDYDISYFVTTDVESFKENDQ
Jnet	
jhmm	
jpssm	
ANT6	WLEIFGKRIMMQKPEDMELFPPELGNWFSYIILFEDGNKLDLTLPIREAEDYFANNDGL
Jnet	
jhmm	
jpssm	
ANT6	VKVLDDKDSFINYKVTPNDRQYWIKRPTAREFDDCCNEFWMVSTYVVKGLARNEILFAID
Jnet	
jhmm	
jpssm	
ANT6	HLNEIVRPNLLRMMAWHIASQKGYFSMGKNYKFMKRYLSNKEWEELMSTYSVNGYQEMW
Jnet	
jhmm	
jpssm	
ANT6	KSLFTCYALFRKYSK
Jnet	
jhmm	
jpssm	

121

Podemos observar que la proteína presenta mayoritariamente motivos de estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice. La determinación del porcentaje de cada tipo estructural se realizó con GOR IV, con el que se obtuvo un 31% de  $\alpha$ -hélice. Este resultado indica que el método de predicción subestima el contenido en  $\alpha$ -hélice de la ANT(6), ya que con los datos obtenidos experimentalmente mediante estudios de dicroísmo circular hallamos un 47.2% de este tipo estructural.

## 2.2-Búsqueda de homólogos remotos mediante predicción de plegamiento.

Mediante los servidores 3D-PSSM, FUGUE y SAM-T99 llevamos a cabo la búsqueda de homólogos remotos mediante predicción de plegamiento. Con los plegamientos propuestos por cada servidor se hizo una clasificación en función de las veces que había sido predicho cada uno de ellos y del porcentaje de identidad con la secuencia problema. Los dos plegamientos más prometedores fueron dos transferasas: la proteína con número de acceso del PDB: 1PX5 (Hartmann *et al.*, 2003) cuya función biológica asignada es la de oligotransferasa y que presentó un 17% de identidad con la ANT(6), y la ANT(4') (número de acceso del PDB: 1KNY) con un 15% de identidad y con la misma función biológica asignada que nuestra proteína. Descartamos la 1PX5 al no presentar la misma función biológica, y continuamos la modelización utilizando como molde la ANT(4') para llevar a cabo el alineamiento entre esta proteína y la ANT(6).

## 2.3- Alineamiento de secuencias ANT(4')-ANT(6).

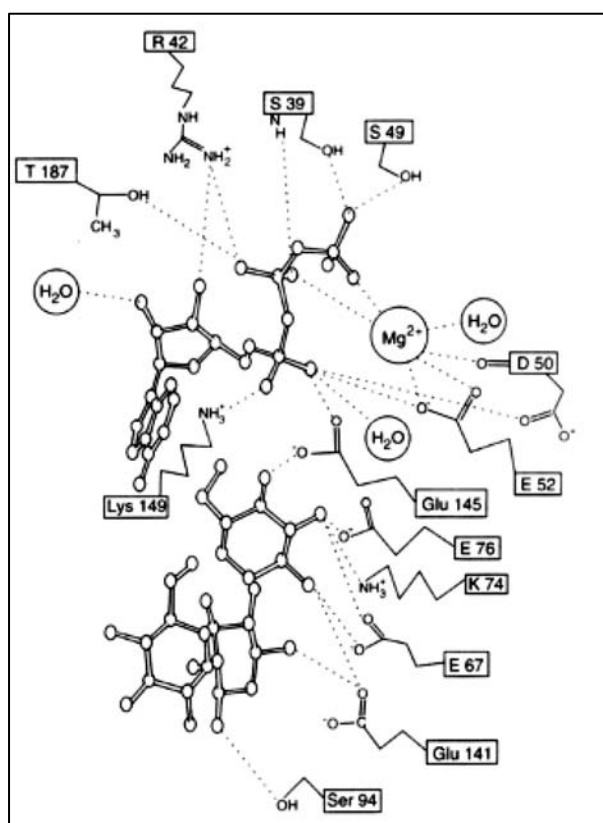
Con el programa CLUSTALW se realizó de forma automática el alineamiento de las dos adeniltransferasas, ANT(4') y ANT(6). Posteriormente se modificó manualmente con el programa SEAVIEW. Para la modificación tuvimos en cuenta tanto el consenso en estructura secundaria de ambas secuencias como la conservación de motivos importantes para la función. En este sentido, las proteínas de la superfamilia de las nucleotidiltransferasas — entre las que se encuentra la ANT(4')— poseen una serie de residuos conservados responsables de la unión de ATP (Martin *et al.*, 2000) (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.** Residuos conservados de unión a ATP en diferentes miembros de la superfamilia de las nucleotidiltransferasas.

Proteína	Residuos conservados
1F5A	Gly100, Ser102, Asp113, Asp115, Asp167
1BPY	Gly82, Ser83, Asp94, Asp96, Asp148
1KNY	Gly38, Ser39, Asp50, Glu52, Glu76

1F5A= Poli(A) polimerasa bovina; 1BPY= ADN-polimerasa  $\beta$  de mamífero; 1KNY: 4'-adeniltransferasa de *Staphylococcus aureus*.

A su vez, al estar resuelta la estructura tridimensional de la ANT(4'), se conocen los residuos de la proteína que interaccionan con el aminoglicósido kanamicina A y el análogo de ATP, AMPCPP (Pedersen *et al.*, 1995) (Figura 4.38).



**Figura 4.38.** Posibles interacciones entre la ANT(4') y los sustratos kanamicina A y AMPCPP a una distancia de 3.2 Å. Modificado de Pedersen *et al.*, 1995.

De hecho, se ha propuesto un mecanismo catalítico en el que el Glu145 actúa como base que sustrae el protón al grupo hidroxilo en posición 4' del anillo I de la kanamicina A, activando el aminoglicósido para el ataque

En la Figura 4.39 se muestra el alineamiento de secuencia que se utilizó para la construcción del modelo tridimensional. Como se puede observar ambas proteínas presentan un gran consenso en los motivos de estructura secundaria, existiendo solo algunas zonas donde hay mayor divergencia, a la vez que se conservan residuos importantes para la unión al ATP.

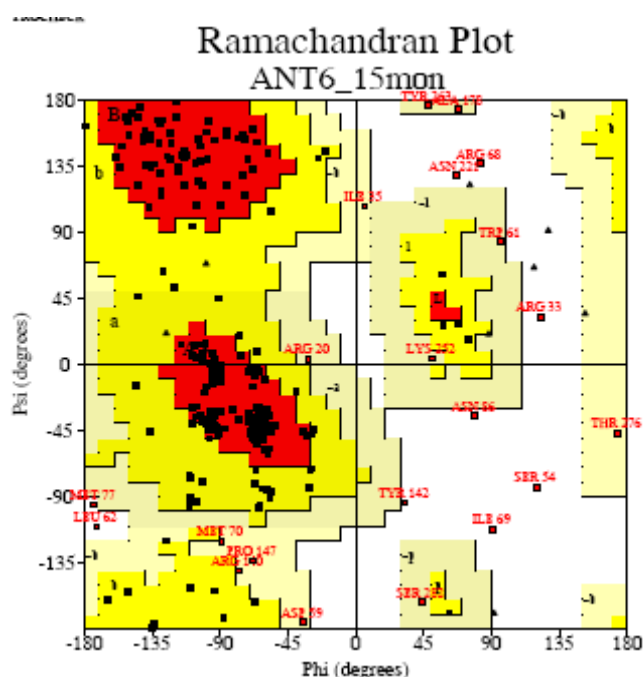


**Figura 4.39.** Alineamiento de secuencias de la 1KNY y la ANT(6). En color verde se muestra las  $\alpha$ -hélices y en magenta las  $\beta$ -lámina. En color rojo están marcados los residuos conservados en la superfamilia de las nucleotidiltransferasas que unen ATP.

Al analizar el alineamiento, y en función de los residuos de la ANT(4') mencionados anteriormente, comprobamos que el Asp126 de la ANT(6) coincide en el alineamiento con un residuo clave de la ANT(4'): el Glu141, la Lys134 de la ANT(6) coincide con la Lys149 y el Glu75 coincide con el Glu93, los cuales podrían actuar como posibles residuos catalíticos.

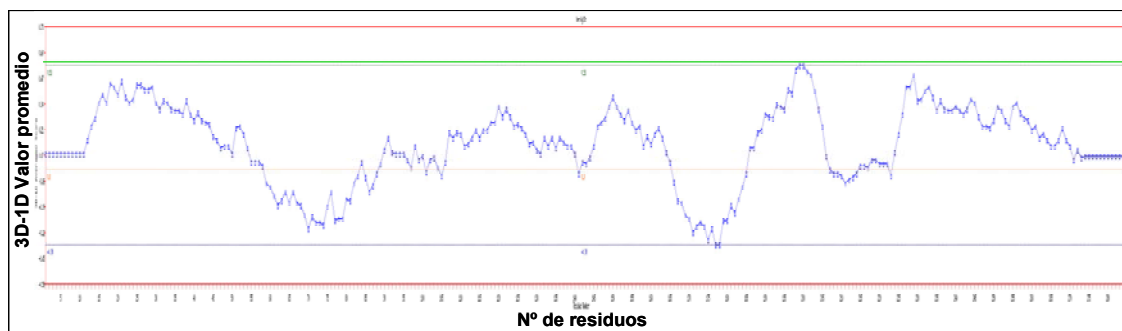
### 3. Modelización de la estructura tridimensional de la ANT(6).

Una vez disponemos de un alineamiento refinado, la modelización molecular de la ANT(6) se llevó a cabo con el programa MODELLER. Los modelos obtenidos fueron evaluados en función de la energía que presentaban. Aquellos con menor valor de energía se evaluaron tanto estereoquímica como energéticamente con PROCHECK y Verify3D respectivamente, a través de la representación de Ramachandran (Figura 4.40) y el perfil energético (Figura 4.41) (Bowie *et al.*, 1991; Lüthy *et al.*, 1992).



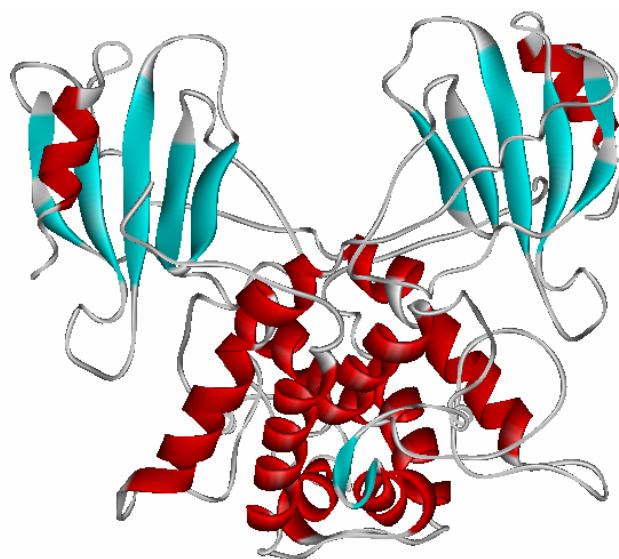
Residuos en regiones más favorables [A, B, L] (Rojo)	73.5%
Residuos en regiones permitidas [a, b, l, p] (Amarillo)	18.2%
Residuos en regiones ligeramente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p] (Beige)	4.2%
Residuos en regiones prohibidas (Blanco)	3.5%
Número de residuos de no glicina y prolina	100%

**Figura 4.40.** Representación de Ramachandran obtenida para la ANT(6). Los triángulos representan los residuos de glicina y los cuadrados el resto de residuos.



**Figura 4.41.** Perfil energético (en azul). Valor promedio de energía por residuo. La línea verde representa el máximo valor obtenido (0.53), comparable al valor promedio (0.76) del patrón 1KNY.

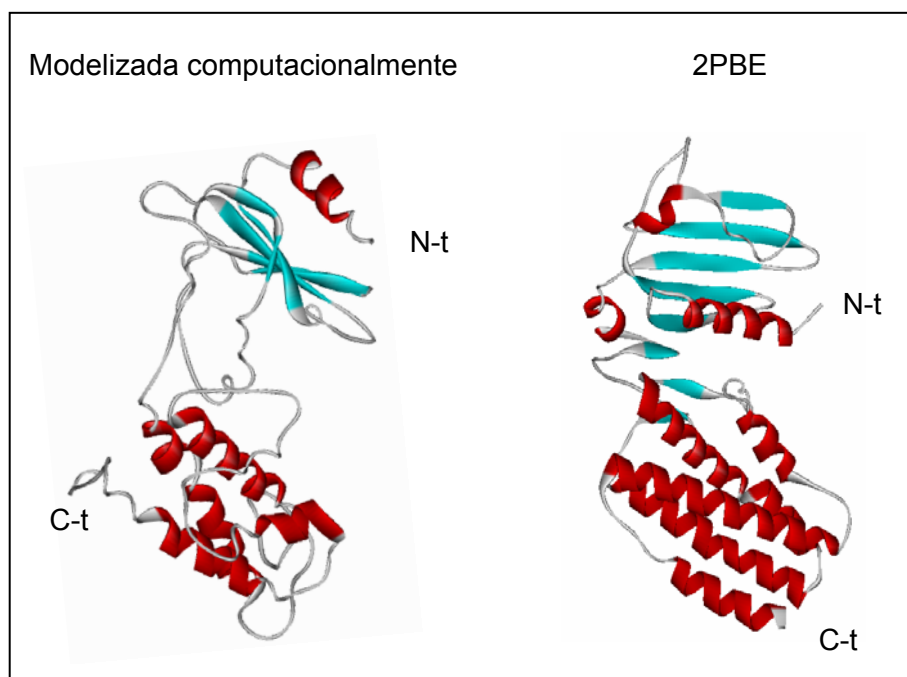
El modelo tridimensional de la ANT(6) obtenido mediante modelización es dimérico y presenta un plegamiento tipo  $\alpha$ - $\beta$  similar al que tiene el patrón estructural que hemos utilizado, la ANT(4') (Figura 4.42). Este modelo presentó un 55% de estructura de tipo  $\alpha$ -hélice y un 13% de  $\beta$ -lámina, porcentajes muy similares a los obtenidos experimentalmente por dicroísmo circular (47.2% de  $\alpha$ -hélice y 12.2% de  $\beta$ -lámina).



**Figura 4.42.** Estructura de la ANT(6) obtenida por modelización molecular.

En el año 2007, se depositó en el Protein Data Bank una estructura tridimensional de la ANT(6) de *Bacillus subtilis* (número de acceso del PDB: 2PBE). Esta estructura se resolvió a 2.65 Å sin ningún sustrato, y se correspondía con un monómero (Figura 4.43). La estructura depositada

presentó un 47% de  $\alpha$ -hélice y un 14% de  $\beta$ -lámina, porcentajes prácticamente iguales a los obtenidos por dicroísmo circular.



**Figura 4.43.** Estructura tridimensional del monómero de ANT(6) obtenido por modelización molecular y el depositado en el Protein Data Bank. N-t= Extremo N-terminal, C-t= Extremo C-terminal.

Al comparar la estructura cristalográfica de la ANT(6) con el monómero de la obtenida por modelización molecular, podemos observar que son similares entre sí (Figura 4.43). Así, el extremo N-terminal presenta un dominio de tipo  $\beta$ -lámina, mientras que el extremo C-terminal presenta un dominio de tipo  $\alpha$ -hélice. Sin embargo, al superponer las dos estructuras con PYMOL se observó que la desviación R.M.S. era muy alta ( $> 3 \text{ \AA}$ ), lo que indica que el esqueleto carbonado de las dos estructuras es muy distinto.

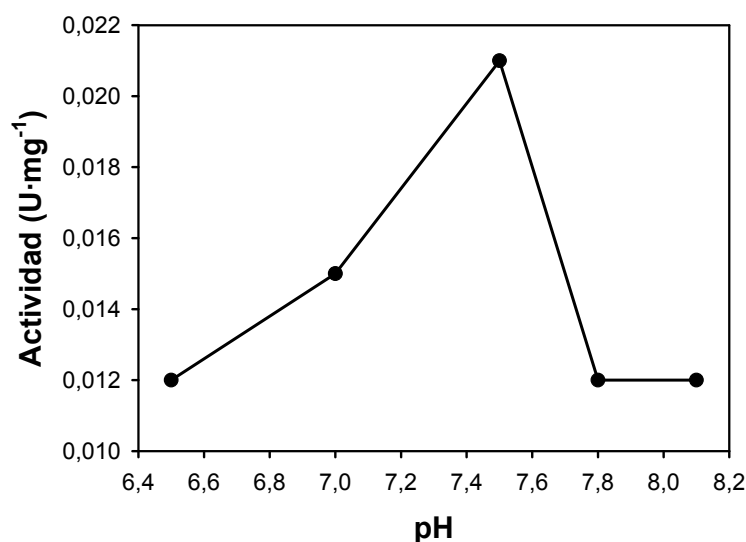
En el caso de la ANT(6) se ha podido comprobar la buena correlación existente entre los datos de estructura secundaria procedentes de técnicas de dicroísmo circular y aquellos obtenidos a partir de la estructura cristalográfica. Existe una mayor discrepancia entre el modelo tridimensional generado computacionalmente y los resultados de dicroísmo circular, pero debe considerarse que el modelo constituye sólo una aproximación teórica a la estructura, para la que no existía un homólogo con estructura conocida.



### - Caracterización cinética de la ANT(6).

#### Efecto del pH en la actividad.

Un estudio inicial del efecto del pH sobre la actividad del enzima nos mostró que la actividad aumentó hasta llegar a un máximo de  $0.021 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  a un pH óptimo de 7.5 (Figura 4.44). A pH 7.8 se detectó una disminución de la actividad a  $0.012 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , que se mantenía hasta un pH superior a 8.



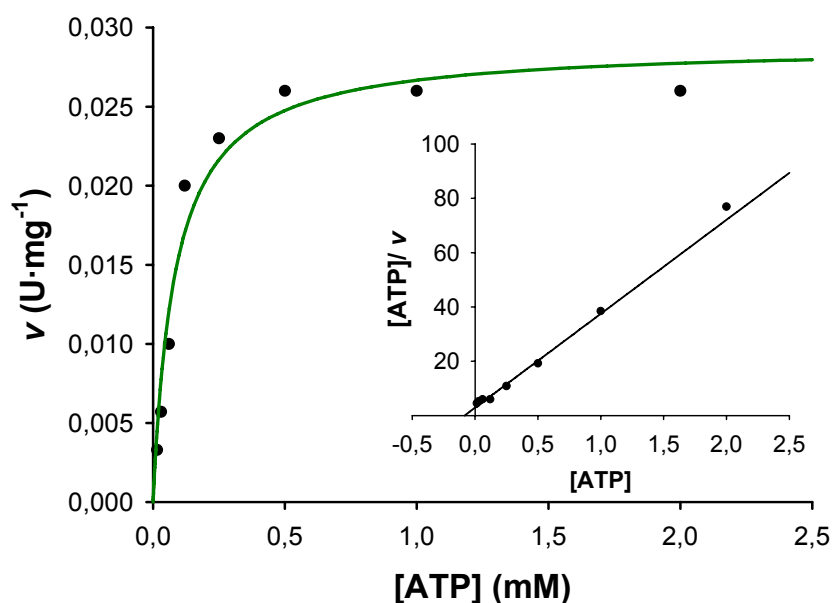
**Figura 4.44.** Efecto del pH sobre la actividad.

En el trabajo de Kono y colaboradores presentan un pH óptimo de 8.0 para el mismo enzima (Kono *et al.*, 1987). Sin embargo, los ensayos enzimáticos se realizaron a un pH de 7.8 al igual que con la ANT(6) de *C. acetoacidophilum* (Jana y Deb, 2005), pH al que detectamos una bajada de actividad cercana al 45% en nuestro caso. En la ANT(2'')-I de *K. pneumoniae*, se halló un pH óptimo a un pH básico de 9.5, detectando una bajada en la actividad a pH 10.0 y una actividad nula por debajo de pH 6.0, por lo que todos los ensayos de actividad realizados posteriormente se hicieron a un pH de 9.0 (Van Pelt y Northrop, 1984), así como los llevados a cabo para determinar el mecanismo cinético del enzima (Gates y Northrop, 1988a; Gates y Northrop, 1988b; Gates y Northrop, 1988c). En el caso de la ANT(4') de *S. aureus*, un estudio del efecto del pH revela que el óptimo es de 7.8, presentando a pH inferiores o superiores una pérdida brusca de actividad (Chen-Goodspeed *et al.*, 1999).

En nuestro caso, el pH óptimo de 7.5 es muy similar a los determinados para las adeniltransferasas estudiadas, excepto para la ANT(2'')-I de *K. pneumoniae* que es de 9.5. Además, aunque detectamos una bajada en la actividad de aproximadamente el 45% a pH 6.5 y 8.1, no es una pérdida total de ésta. Esto podría ser debido a que el sustrato natural de la ANT(6), la estreptomycin, posee en su estructura grupos guanidínios en lugar de aminos que es lo habitual en los antibióticos aminoglicósidos. Los grupos guanidínios tienen un pK de 12.5 y van a estar protonados en disolución, mientras que los grupos aminos de los aminoglicósidos poseen un pK entre 6.5 y 8. Así, variaciones más leves en el pH pueden dar lugar a una mayor pérdida de actividad en aquellos enzimas que tienen como sustratos aminoglicósidos con grupos amino en su estructura, mientras que en el caso de la ANT(6), ésta conserva un porcentaje de su actividad adeniltransferasa debido a la particularidad de la presencia de estos grupos guanidínios.

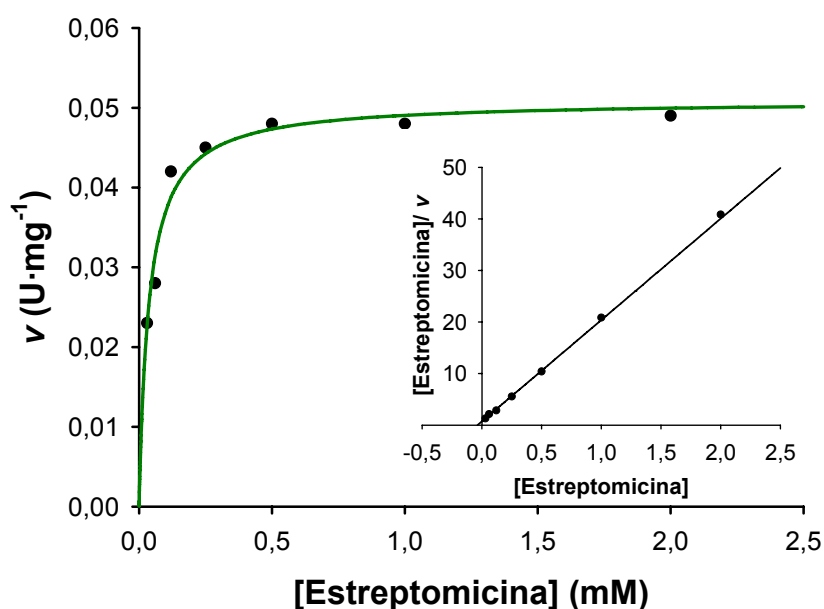
#### Determinación de los parámetros cinéticos.

Los parámetros cinéticos aparentes de la ANT(6) con respecto al sustrato ATP mostraron un comportamiento de tipo Michaelis-Menten (Figura 4.45), con una  $K_M$  de  $8.4 \cdot 10^{-5}$  M. La  $k_{cat}$  calculada fue  $0.018 \text{ s}^{-1}$ , y se obtuvo una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de  $2.1 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  (Tabla 4.8).



**Figura 4.45.** Actividad de la ANT(6) a concentraciones crecientes de ATP. Los datos se ajustaron a una curva de tipo hiperbólico. En el inserto se muestra la representación secundaria de Hanes-Woolf.

La ANT(6) mostró también un comportamiento michaeliano con respecto a la estreptomicina (Figura 4.46). La  $K_M$  hallada fue  $3.8 \cdot 10^{-5}$  M, la  $k_{cat}$   $0.032 \text{ s}^{-1}$  y se obtuvo una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de  $8.4 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  (Tabla 4.8).



**Figura 4.46.** Actividad de la ANT(6) a concentraciones crecientes de estreptomicina. Los datos se ajustaron a una curva de tipo hiperbólico. En el inserto se muestra la representación secundaria de Hanes-Woolf.

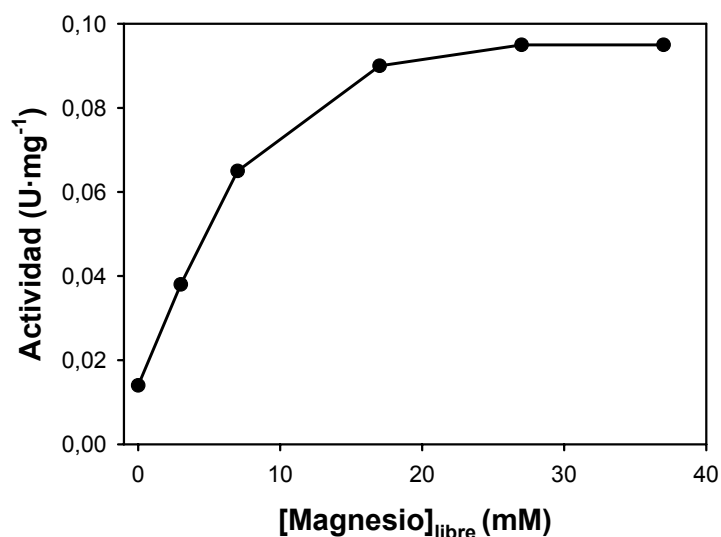
**Tabla 4.8.** Parámetros cinéticos aparentes de la ANT(6) para los sustratos estreptomicina y ATP.

Sustrato	$K_M$ (M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1} \cdot M^{-1}$ )
Estreptomicina	$3.8 \cdot 10^{-5}$	0.032	$8.4 \cdot 10^2$
ATP	$8.4 \cdot 10^{-5}$	0.018	$2.1 \cdot 10^2$

En cuanto a la ANT(6) estudiada por Kono y colaboradores, se describió una  $K_M$  para el sustrato estreptomicina de  $8 \cdot 10^{-5}$  M (Kono *et al.*, 1987), que es del mismo orden de magnitud que la obtenida en nuestro caso.

#### Efecto del magnesio en la actividad.

Por otro lado, estudiamos el efecto del exceso de ión  $Mg^{2+}$  sobre la actividad del enzima. La máxima actividad se dio a una concentración de  $Mg^{2+}$  libre de 17 mM (Figura 4.47). Por encima de esa concentración no se detectó un aumento en la actividad ni tampoco un efecto inhibitorio, hasta una concentración de  $Mg^{2+}$  libre de 37 mM.



**Figura 4.47.** Efecto del magnesio libre sobre la actividad de la ANT(6). Todas las reacciones se realizaron a una concentración de 3 mM de ATP y entre 3 y 40 mM de  $MgCl_2$ .

Sólo existe un estudio similar con la ANT(4') de *S. aureus* (Chen-Goodspeed *et al.*, 1999). En él se determinó la actividad máxima a una

concentración de  $Mg^{2+}$  libre de 2 mM y se observó un efecto inhibitorio a concentraciones superiores a 7 mM de  $Mg^{2+}$  libre. En el caso de otras adeniltransferasas, como la ANT(2'')-I de *K. pneumoniae* y la ANT(2'')-Ia de *P. aeruginosa*, la concentración de  $Mg^{2+}$  libre en el medio de reacción se fijó entre 5 y 10 mM, aunque en ninguno de ellos realizaron un estudio para averiguar el efecto de la concentración de  $Mg^{2+}$  libre sobre la actividad del enzima (Gates y Northrop, 1988; Wrigth y Serpersu, 2005).

En nuestro caso, observamos que para alcanzar la actividad máxima es necesaria una cantidad de magnesio mayor que la requerida para quelar el ATP. Algunos autores sugieren que esto podría ser debido a que el enzima necesitase dos moléculas de ión divalente para llevar a cabo su actividad: una que se uniese al ATP y la otra directamente al enzima (Wrigth y Serpersu, 2005). Este fenómeno se ha observado en la estructura tridimensional de un enzima de la familia de las O-fosfotransferasas, la APH(3')-IIIa (Burk *et al.*, 2001), aunque no se llevó a cabo un estudio del efecto del exceso de  $Mg^{2+}$  libre en la reacción. Sin embargo, en la estructura cristalográfica de la ANT(4') de *S. aureus*, sólo se observa un ión divalente en cada centro activo de los dos monómeros (Sakon *et al.*, 1993), aunque se determinó una concentración de  $Mg^{2+}$  libre de 2 mM para alcanzar la actividad máxima del enzima. En el caso de la ANT(6), serían necesarios más estudios para poder determinar más detalladamente el papel del  $Mg^{2+}$ , aunque sí está claro que el magnesio libre está ejerciendo un efecto sobre la actividad del enzima.

#### Efecto de diferentes iones divalentes en la actividad.

Cuando se comparó la influencia en la actividad de los iones divalentes  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , utilizando un pequeño exceso de ión libre (5 mM de la correspondiente sal y 3 mM de ATP), observamos que el  $MnCl_2$  daba lugar a la actividad más alta de todas. Así, la actividad obtenida con manganeso en estas condiciones fue cuatro veces mayor que la que se obtuvo con  $MgCl_2$  y ~10 veces superior a la obtenida con  $CaCl_2$  (Tabla 4.9).

**Tabla 4.9.** Efecto de diferentes iones divalentes<sup>a</sup> sobre la actividad de la ANT(6).

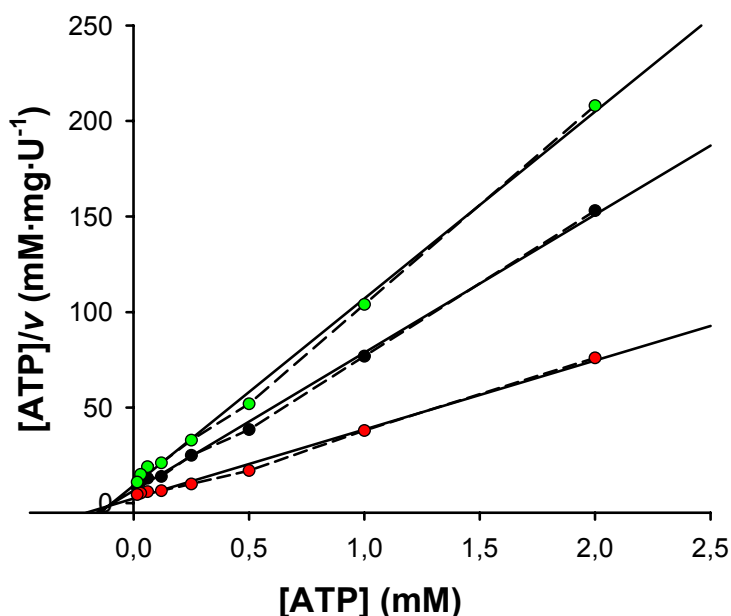
	<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>MnCl<sub>2</sub></b>
<b>Actividad (U·mg<sup>-1</sup>)</b>	0.007	0.02	0.08

<sup>a</sup> La concentración de la correspondiente sal fue de 5 mM en cada caso.

Debemos tener en cuenta que la actividad máxima con Mg<sup>2+</sup> se alcanza a una concentración de ión libre mucho mayor que la utilizada en este ensayo. Aunque no podemos concluir el efecto exacto del ión Mn<sup>2+</sup>, los resultados obtenidos pueden indicar que la actividad máxima con este ión se alcance a concentraciones menores que en el caso del Mg<sup>2+</sup> y que esto estuviera motivado por una interacción más fuerte del Mn<sup>2+</sup> con el enzima (Wright y Serpersu, 2005).

#### Determinación del mecanismo cinético.

Nos propusimos averiguar el mecanismo cinético de la reacción bisustrato que cataliza el enzima ANT(6). Para ello, fijamos varias concentraciones de estreptomycin y a cada una de ellas se determinó la velocidad inicial a determinadas concentraciones de ATP. Las representaciones secundarias de Hanes-Woolf mostraron un patrón de líneas que convergen en el mismo punto del segundo cuadrante y que poseen una menor pendiente y ordenada en el origen a medida que aumenta la concentración del sustrato estreptomycin, indicando un mecanismo cinético de tipo secuencial (Figura 4.48).



**Figura 4.48.** Representación de Hanes-Woolf de las tres reacciones a concentraciones variables de ATP y concentraciones fijas de estreptomicina: (●) 2 mM de estreptomicina, (●) 1 mM de estreptomicina, y (●) 0.7 mM de estreptomicina.

La ANT(6) de *C. acetoacidophilum* estudiada por Deb y colaboradores, sigue un mecanismo secuencial ordenado en el que el primer sustrato que se une al enzima es el Mg-ATP seguido de la estreptomicina. Los autores sugieren un mecanismo de tipo Theorell-Chance en el que el pirofosfato inorgánico sale del enzima antes de que se forme el producto AMP-estreptomicina, cuya salida es la etapa limitante de la reacción (Jana y Deb, 2005). No existen datos sobre este aspecto de la ANT(6) de *B. subtilis* estudiada por Kono y colaboradores. Tal como indicábamos en la Introducción de esta Memoria, tanto la ANT(4') de *S. aureus*, como la ANT(2'')-I de *K. pneumoniae*, también siguen un mecanismo cinético secuencial ordenado (Gates y Northrop, 1988a; Gates y Northrop, 1988b; Gates y Northrop, 1988c; Chen-Goodspeed *et al.*, 1999). Mientras que en el caso de la ANT(4') el primer sustrato que entra es el aminoglicósido, en la ANT(2'')-I el primero en entrar es el Mg-ATP, al igual que en la ANT(6) estudiada por Deb y colaboradores. En nuestro caso, hemos encontrado que el mecanismo es de tipo secuencial, al igual que en el resto de adeniltransferasas estudiadas hasta la fecha. Para poder averiguar si la ANT(6) sigue un mecanismo secuencial ordenado o al azar, así como el sustrato que se une antes al enzima y el orden de salida de

los productos, tendríamos que llevar a cabo un estudio de inhibiciones por producto (Tabla 4.10), en el que según el patrón de inhibiciones detectadas se puede determinar el tipo de mecanismo.

**Tabla 4.10.** Inhibiciones por producto en una reacción bisustrato.

Mecanismo	Sustrato variable	Sustrato constante <sup>a</sup>	Inhibidor	Tipo de inhibición
<b>Secuencial ordenado</b>	A	B	Q	Competitiva
	A	B	P	Acompetitiva
	B	A	Q	Mixta
	B	A	P	No Competitiva
<b>Secuencial al azar</b>	A	B	Q	Competitiva
	A	B	P	Competitiva
	B	A	Q	Competitiva
	B	A	P	No Competitiva

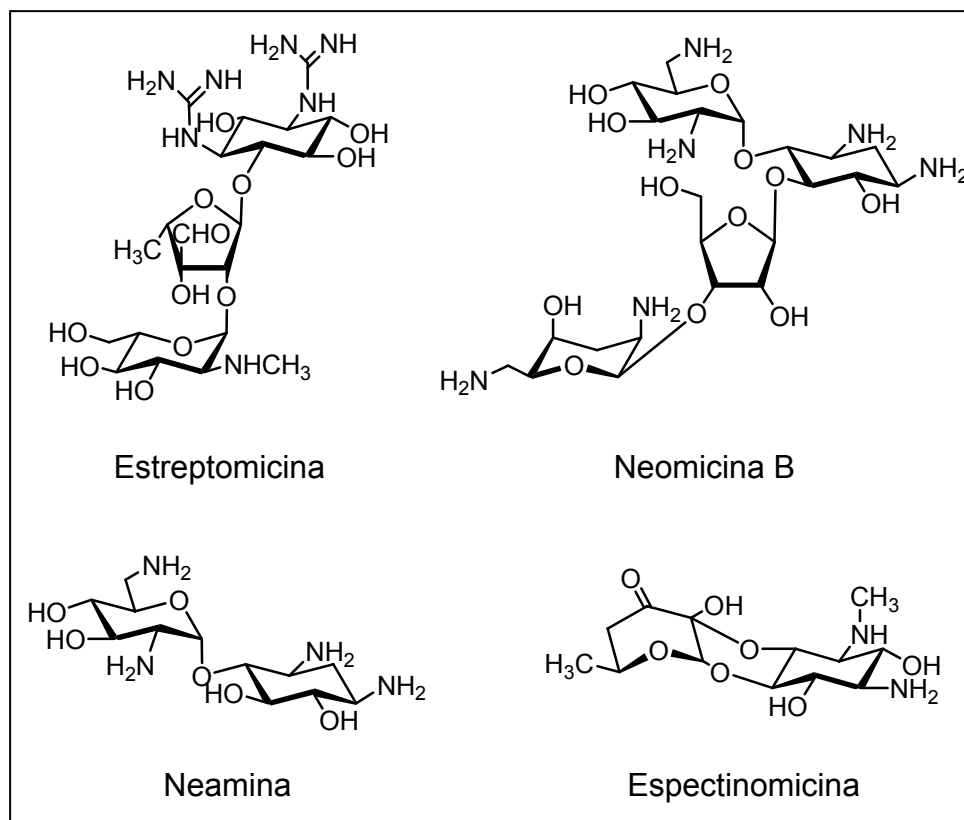
<sup>a</sup> El sustrato constante ha de estar a concentraciones saturantes.

#### Estudios *in vitro* e *in vivo* de especificidad por el sustrato aminoglicósido.

Los antibióticos aminoglicósidos que utilizamos en este estudio fueron: la neomicina B, de la familia de la 2-desoxiestreptamina disustituida en las posiciones 4 y 5; la neamina procedente de la hidrólisis de neomicina B; un aminoglicósido cuyo anillo central de aminociclitol no fuese la 2-desoxiestreptamina, la espectinomicina; y el sustrato natural de la ANT(6), la estreptomicina (Figura 4.49).

Los ensayos *in vitro* reflejaron que la ANT(6) era muy poco activa cuando el sustrato de la reacción era la neomicina B o la neamina, detectándose una baja formación de producto a las 24 h de reacción (Tabla 4.11). Las actividades obtenidas fueron tres órdenes de magnitud menor con respecto a la de la estreptomicina. En presencia de espectinomicina, no se detectó formación de producto.





**Figura 4.49.** Estructura de los antibióticos aminoglicósidos utilizados en los ensayos de especificidad de sustrato *in vitro* e *in vivo*.

**Tabla 4.11.** Actividad *in vitro* de la ANT(6) con diferentes antibióticos aminoglicósidos.

Aminoglicósido	Actividad (U·mg <sup>-1</sup> )
Estreptomicina	0.021
Neomicina B	0.3·10 <sup>-4</sup>
Neamina	0.2·10 <sup>-4</sup>
Espectinomicina	0

Así, parece que la ANT(6) exhibe una especificidad alta con respecto al antibiótico aminoglicósido estreptomicina, a diferencia de otras adeniltransferasas como la ANT(4') que poseen una amplia especificidad por el aminoglicósido (Chen-Goodspeed *et al.*, 1999).

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en la cepa control BL21(DE3) de *E. coli* y en la cepa recombinante BL21(DE3)/pET-*aadK* de *E. coli* que sobreexpresa el enzima ANT(6). Con este tipo de ensayos podemos calcular la CMI, que es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de

una cepa bacteriana. Así, la medida del crecimiento y viabilidad de la cepa recombinante en presencia de diferentes antibióticos nos indicará también cuales de ellos podrían ser sustrato de la ANT(6) *in vivo* (Tabla 4.12).

**Tabla 4.12.** Actividad *in vivo* de diversos antibióticos aminoglicósidos expresada en valores de CMI en una cepa control y en la cepa que sobre-expresa la ANT(6).

Aminoglicósido	CMI (µg/mL)	
	BL21(DE3)	BL21(DE3)/ pET- <i>aadK</i>
Estreptomicina	5	>200
Neomicina B	2	50
Neamina	50	>400
Espectinomicina	10	10

Tal como esperábamos, la estreptomicina actuó como un potente antibiótico en la cepa control (con una CMI de 5 µg/mL) y no presentó poder antibiótico en la cepa recombinante que sobre-expresa el enzima ANT(6), ya que ésta se encarga de adenilarlo y por lo tanto, desactivarlo. Así, en el caso de la cepa recombinante necesitamos concentraciones altas de antibiótico para poder ver una reducción en el crecimiento del cultivo bacteriano (>200 µg/mL). La neomicina B también actuó como un antibiótico efectivo ante la cepa control con una CMI de 2 µg/mL, pero parte de esta acción antibiótica la pierde en la cepa que sobre-expresa la ANT(6) ya que en este caso posee una CMI de 50 µg/mL, por lo que se podría estar siendo adenilada una pequeña cantidad de neomicina B. En los ensayos *in vitro*, se detectó una baja formación de producto cuando el sustrato era la neomicina B, y por experimentos de RMN se detectó unión del antibiótico a la proteína (Corzana *et al.*, 2005). La neomicina B posee un grupo hidroxilo en la posición 6 de su anillo II, que sería susceptible de ser adenilado. La neamina presentó una débil acción antibiótica en la cepa control (CMI de 50 µg/mL) y un efecto nulo sobre la cepa recombinante (CMI >400 µg/mL). La diferencia del valor de CMI entre los dos tipos de cepas se podría deber a que en presencia de ANT(6), la neamina podría estar siendo adenilada. La neamina mantiene el anillo II de la neomicina B, por lo que

también sería susceptible de ser adenilada en esa misma posición. Por último, la espectinomicina actuó como antibiótico en la cepa control (CMI de 10 µg/mL), aunque no es tan potente como la estreptomicina y la neomicina B. En la cepa recombinante mantuvo su acción antibiótica, por lo que, al igual de lo que ocurría *in vitro*, no parece ser sustrato de la ANT(6).

#### Estudios de reconocimiento molecular y especificidad por el nucleótido.

A continuación, se evaluó el proceso de reconocimiento del nucleótido por la ANT(6) mediante experimentos de RMN en colaboración con el grupo del Dr. Juan Luis Asensio del Instituto de Química Orgánica General del CSIC (Corzana *et al.*, 2005). Los datos obtenidos con ATP y AMP revelaron que ambos eran reconocidos por el enzima, pero éste tenía una mayor afinidad por el ATP, por lo que la molécula de trifosfato podría contribuir a la estabilidad del complejo.

Para realizar un estudio más detallado del modo de unión del nucleótido a la proteína se realizaron experimentos de STD-RMN (Meyer y Peters, 2003). En un experimento de STD (Diferencia de Transferencia de Saturación) se pueden identificar las señales del ligando que están más afectadas por la transferencia de saturación debido a la presencia de la proteína y así determinar qué protones del ligando están en contacto con el sitio de unión a ésta. Los ensayos de STD-RMN sugieren una forma de unión muy similar para el ATP y el AMP y se detectaron dos zonas que intervienen en el proceso de unión a la proteína: la molécula de trifosfato y el anillo de adenina. Este tipo de estudio se llevó a cabo con otros nucleótidos con el fin de determinar la especificidad del enzima. De ellos se puede deducir que la ANT(6) reconoce el GTP con la misma afinidad que por el ATP, y que en el caso de los nucleótidos CTP y UTP existe también un cierto reconocimiento pero mucho más débil.

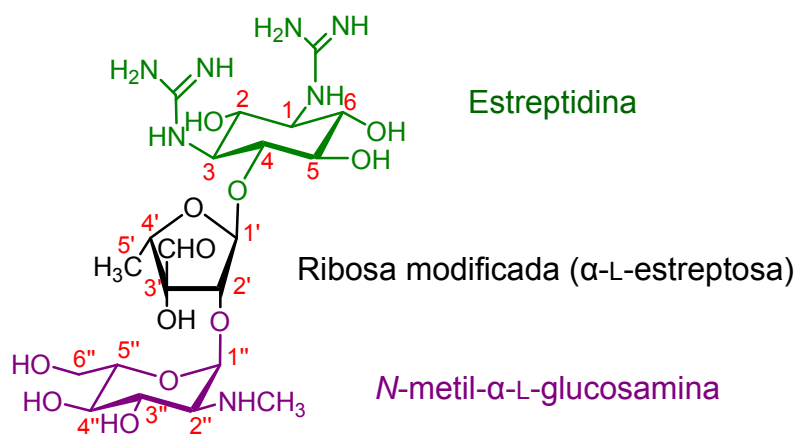
Al evaluar la actividad enzimática con estos nucleótidos, se detectó formación de producto en el caso de las reacciones con GTP y ATP tras 2 h de reacción. Sin embargo, en presencia de CTP y UTP en las mismas condiciones de ensayo sólo se pudo detectar producto tras un periodo de 24 h y con un

exceso de ANT(6). De acuerdo con estos datos, la ANT(6) muestra preferencia por nucleótidos trifosfato que poseen una base de purina (adenina o guanina).

- **Recuperación de la actividad antibiótica de la estreptomicina.**

**- Estudios de reconocimiento molecular de la estreptomicina.**

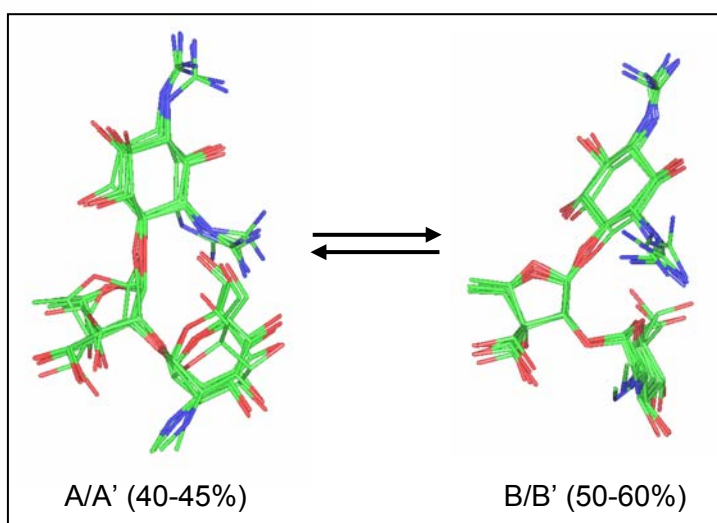
Debido a que en el momento de realizar este trabajo no existía información sobre la estructura detallada de ninguna 6- adeniltransferasa, ya fuese por RMN o difracción de rayos-X, nuestro grupo de investigación se planteó como un primer paso en la comprensión de los requisitos estructurales para la interacción del enzima con el antibiótico, el estudio conformacional del antibiótico estreptomicina (Figura 4.50) tanto en estado libre, como acomplejado con el enzima ANT(6). Éstos se llevaron a cabo por métodos de RMN y de dinámica molecular. A su vez, se analizó el posible epítipo de reconocimiento para el antibiótico y con experimentos de STD-RMN. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Juan Luis Asensio (Corzana *et al.*, 2005).



**Figura 4.50.** Estructura del antibiótico estreptomicina

El análisis de la conformación libre de la estreptomicina en disolución mostró que los dos enlaces glicosídicos están caracterizados por la presencia de dos conformaciones mayoritarias denominadas A y B para el enlace entre la unidad de estreptidina y la estreptosa, y A' y B' para el enlace entre la

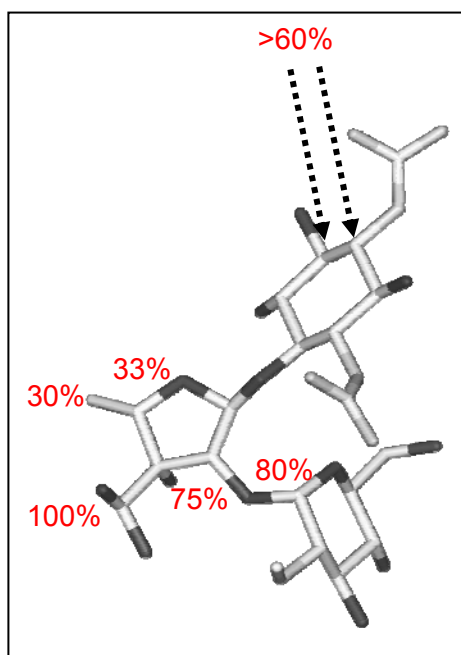
estreptosa y la glucosamina (Figura 4.50). Las fluctuaciones conformacionales entre los dos enlaces glicosídicos están fuertemente correlacionadas. Así, la transición  $A \rightarrow B$  o  $B \rightarrow A$  para el enlace entre la estreptidina y la estreptosa, va acompañada de la transición  $A' \rightarrow B'$  o  $B' \rightarrow A'$  respectivamente, para el enlace entre la estreptosa y la glucosamina. Así, la estructura de la estreptomina en disolución está caracterizada por la presencia de dos conformaciones mayoritarias denominadas A/A' y B/B' con unas poblaciones de 40-45% y 50-60% respectivamente (Figura 4.51).



**Figura 4.51.** Representación esquemática de las dos familias de conformaciones mayoritarias presentes en la estreptomina en disolución.

Al observar que la estreptomina es bastante flexible en disolución, el siguiente paso del estudio fue averiguar si alguna de estas conformaciones es la que reconoce el enzima ANT(6), por lo que se determinó la estructura que adoptaba el antibiótico en complejo con la ANT(6). Tal como se esperaba, la flexibilidad en la conformación de la estreptomina se reduce al unirse a la proteína, y la conformación que presenta unida al enzima ANT(6) es parecida a la conformación B/B'. Para realizar un estudio más detallado del modo de unión del antibiótico a la proteína se realizaron experimentos de STD-RMN. A lo largo de la molécula de estreptomina existe transferencia de saturación significativa en regiones muy concretas que comprenden el anillo de estreptosa (posiciones 2', 3' y 4'), la posición 1'' de la glucosamina y los protones H1 y H6 de la unidad de estreptidina (Figura 4.52). Esto era de esperar, ya que la posición 6 es la

que modifica el enzima y por lo tanto debe estar en contacto muy próximo con el centro activo.



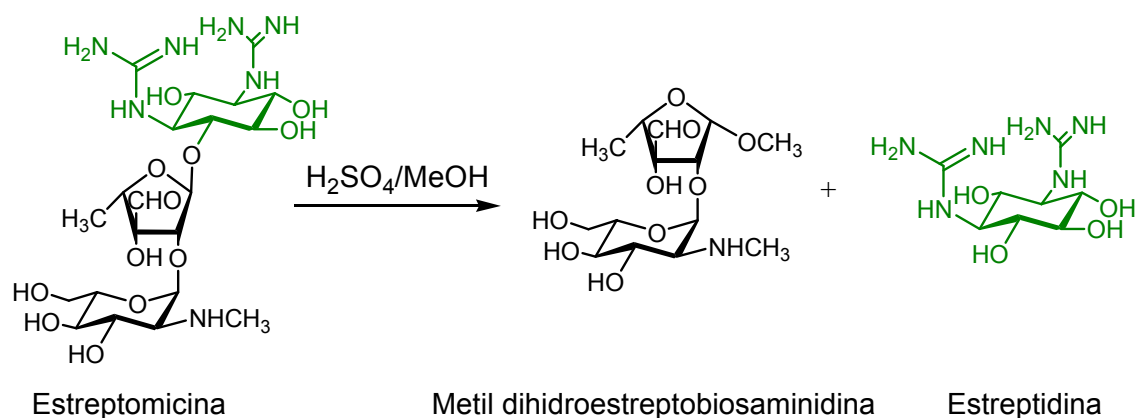
**Figura 4.52.** Señales de STD-RMN más significativas de la estreptomicina en complejo con la ANT(6).

#### **- Obtención y caracterización de estreptidina.**

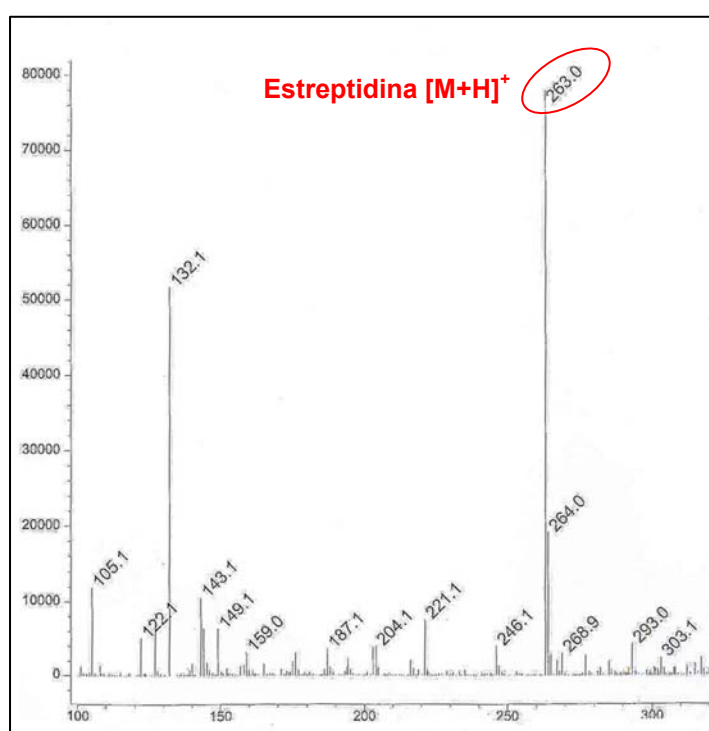
Al observar que es la molécula de estreptidina la que forma el epítipo de reconocimiento del centro activo, nos planteamos su obtención con el fin de averiguar si se podría comportar como un posible sustrato o inhibidor del enzima ANT(6). Si esta hipótesis resultaba cierta, podríamos utilizar este compuesto con el objetivo de recuperar la actividad antibiótica de la estreptomicina frente a una cepa resistente.

La obtención de estreptidina se realizó mediante hidrólisis ácida del antibiótico estreptomicina (Peck *et al.*, 1946) (Figura 4.53).

La estreptidina se obtuvo como un precipitado blanco de gran pureza con un rendimiento de la reacción del 40%. La identidad del producto fue inequívocamente establecida mediante espectrometría de masas (Figura 4.54) y  $^1\text{H}$ -RMN.



**Figura 4.53.** Hidrólisis ácida de la estreptomicina.

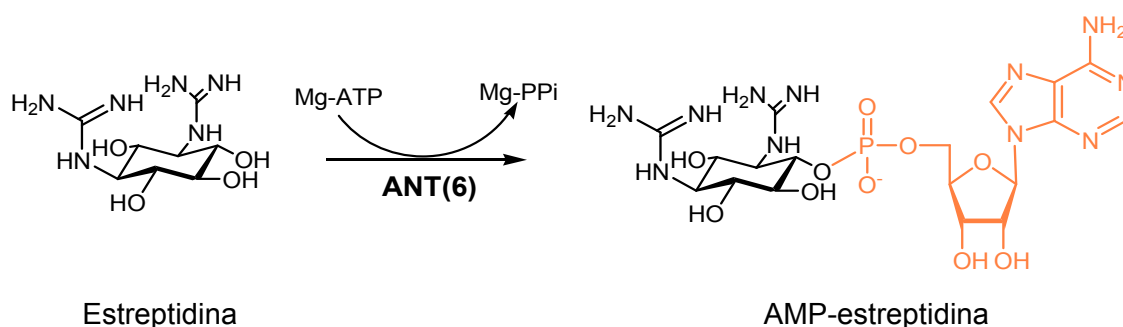


**Figura 4.54.** Espectro de masas de la identificación de estreptidina tras la hidrólisis ácida de estreptomicina.

#### **- Estudio *in vitro* de la estreptidina y determinación de los parámetros cinéticos.**

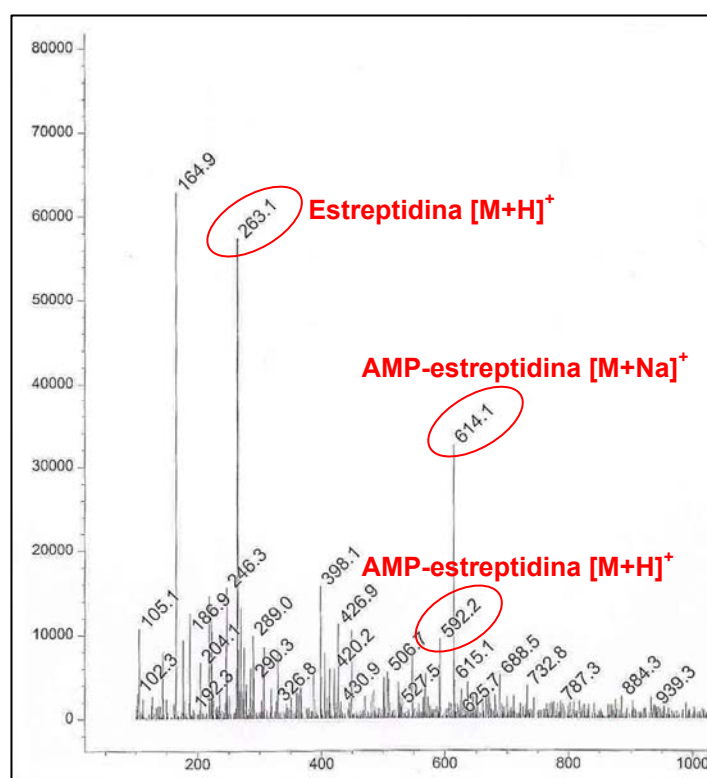
Como hemos mencionado anteriormente, habíamos establecido que la estreptidina era capaz de interaccionar con el enzima ANT(6). Por lo tanto, para determinar si la estreptidina era un inhibidor del enzima o podía ser utilizado

como sustrato, llevamos a cabo en primer lugar la reacción de adenilación utilizando este compuesto como aceptor (Figura 4.55).



**Figura 4.55.** Reacción de adenilación de la estreptidina catalizada por la ANT(6).

Después de 48 h de reacción, pudimos identificar un producto de reacción que fue identificado como AMP-estreptidina por espectrometría de masas (Figura 4.56),  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.



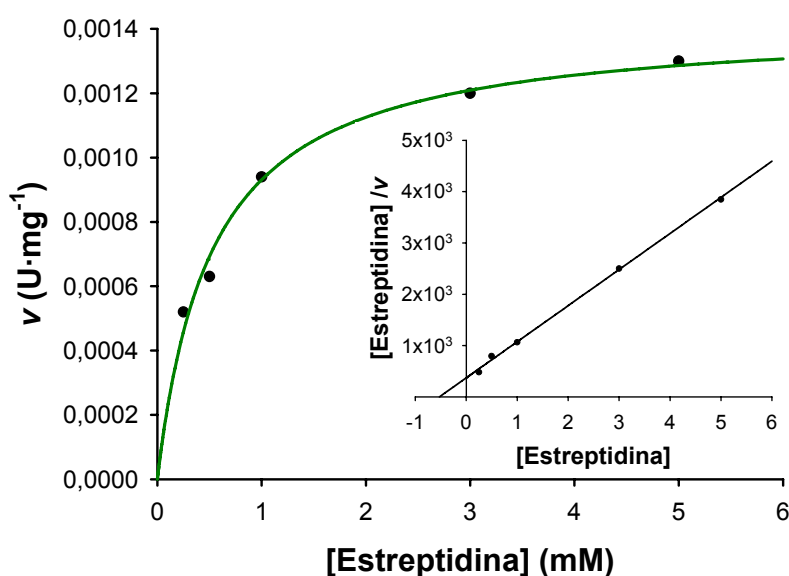
**Figura 4.56.** Espectro de masas del análisis del producto de reacción de la estreptidina con la ANT(6).

Así, la estreptidina actúa como un sustrato de la ANT(6) aunque sólo pudimos identificar el producto en unas condiciones de reacción con un exceso



de enzima y tras un largo tiempo, por lo que en un principio, la estreptidina no sería tan buen sustrato como la estreptomicina.

A continuación hallamos los parámetros cinéticos aparentes de la ANT(6) con respecto a la estreptidina. Los datos muestran un comportamiento de tipo Michaelis-Menten (Figura 4.57) con una  $K_M$  de  $6 \cdot 10^{-4}$  M. La  $k_{cat}$  hallada fue  $7.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  y se obtuvo una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de  $1.2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  (Tabla 4.13).



**Figura 4.57.** Actividad de la ANT(6) a concentraciones crecientes de estreptidina. Los datos se ajustaron a una curva de tipo hiperbólico. En el inserto se muestra la representación secundaria de Hanes-Woolf.

En comparación con los parámetros obtenidos para la estreptomicina, podemos ver que la ANT(6) tiene menor afinidad por la estreptidina que por su sustrato natural, tal como podemos determinar por el valor de  $K_M$ . La eficacia catalítica es dos órdenes de magnitud inferior, por lo que la estreptidina es peor sustrato que la estreptomicina para la ANT(6) (Tabla 4.13).

**Tabla 4.13.** Parámetros cinéticos aparentes de la ANT(6) con respecto a la estreptomicina y estreptidina.

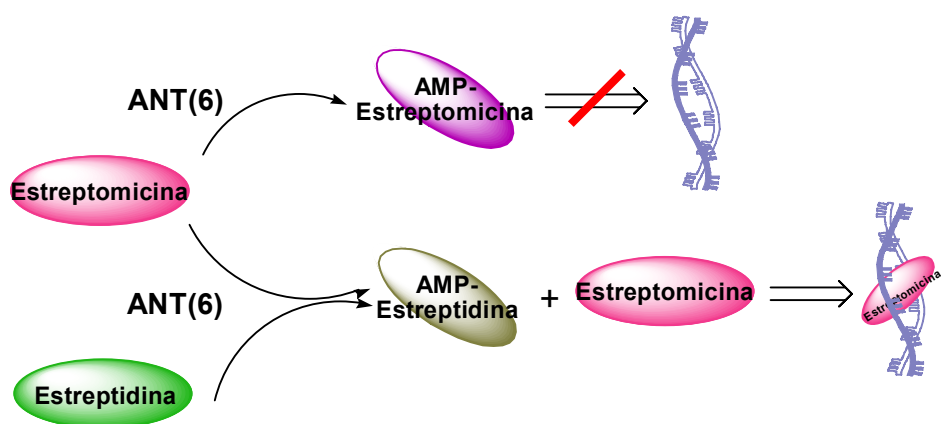
Sustrato	$K_M$ (M)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ )
Estreptidina	$6 \cdot 10^{-4}$	$7.5 \cdot 10^{-4}$	1.2
Estreptomicina	$3.8 \cdot 10^{-5}$	$3.2 \cdot 10^{-2}$	$8.4 \cdot 10^2$

**- Estudios *in vivo* de la estreptidina y de la administración conjunta de estreptomicina y estreptidina.**

Tal como hemos mencionado en la Introducción de esta Memoria, una aproximación para revitalizar antibióticos ya conocidos es la inhibición de los mecanismos de resistencia bacterianos permitiendo que el antibiótico pueda actuar de nuevo. Existen varios ejemplos de este tipo de “terapia combinada”, pero ninguno de ellos en el grupo de los antibióticos aminoglicósidos. Ahora bien, el compuesto que presumimos podría ser un inhibidor —la estreptidina— había resultado ser sustrato del enzima. ¿Era posible entonces trasladar la propuesta anteriormente descrita al caso concreto de la pareja estreptomicina/estreptidina?

Desde 1973 se conoce que determinados xilopiranósidos (xilosa unida a aglicones hidrofóbicos) son capaces de “cebar” la síntesis de los aminoglicanos (Okayama *et al.*, 1973). Estos autores introdujeron el término de “aceptor trampa” para designar a aquellos compuestos que siendo sustratos de un determinado enzima son capaces de inhibir una ruta metabólica, distinguiéndoles de los inhibidores que engloban compuestos que no son modificados por el enzima. Estos compuestos se popularizaron posteriormente como inhibidores de la síntesis de proteoglicanos ya que al “cebar”, actuando como aceptores trampa, la síntesis de los aminoglicanos, su acción resultaba en la inhibición de la biosíntesis de proteoglicanos sulfatos de coindritina y heparano (Esko *et al.*, 1994).

Dado que la estreptidina era sustrato del enzima ANT(6), decidimos estudiar si podría actuar *in vivo* como un aceptor trampa, de forma que al administrarla conjuntamente con la estreptomicina la ANT(6) “estuviera ocupada” modificando la estreptidina y por lo tanto, permitiendo la recuperación de la actividad antibiótica de la estreptomicina (Figura 4.58).



**Figura 4.58.** Esquema de la recuperación de la actividad antibiótica de la estreptomicina en presencia de estreptidina en cepas que sobre-expresan el enzima ANT(6).

En primer lugar, nos planteamos si la estreptidina actuaba o no como antibiótico. Para ello calculamos su CMI para la cepa control BL21(DE3). Los resultados mostraron que la estreptidina no ejercía acción antibiótica al no detectarse disminución en el crecimiento bacteriano, ya que el valor de CMI fue superior a 400  $\mu\text{g/mL}$ . También se analizó su actividad en la cepa BL21(DE3)/pET-*aadK* que sobre-expresa la ANT(6) y, como era de esperar comprobamos que en este caso tampoco mostraba actividad antibiótica (Tabla 4.14).

**Tabla 4.14.** Actividad *in vivo* de la estreptomicina y la estreptidina expresada en valores de CMI en cada caso.

CEPA	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Estreptomicina	Estreptidina	Estreptomicina + Estreptidina
BL21(DE3)	5	>400	5
BL21(DE3)/pET- <i>aadK</i>	>200	>400	50 <sup>a</sup> 10 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Valor de CMI para la estreptomicina en presencia de 50  $\mu\text{g/mL}$  de estreptidina.

<sup>b</sup> Valor de CMI para la estreptomicina en presencia de 400  $\mu\text{g/mL}$  de estreptidina.

Al administrar de forma conjunta la estreptomicina y la estreptidina, observamos que en la cepa control la estreptomicina posee la misma acción

antibiótica que en ausencia de estreptidina (5 µg/mL). En la cepa recombinante que sobre-expresa ANT(6) obtuvimos que la estreptomycin recuperaba en parte su acción antibiótica al estar presente la estreptidina (Tabla 4.14). Así, la CMI de la estreptomycin para la cepa BL21(DE3)/pET-*aadK* bajaba de >200 µg/mL a sólo 50 µg/mL cuando se administraba junto con 50 µg/mL de estreptidina. Esta bajada de la CMI de la estreptomycin —y por lo tanto recuperación de su actividad antibiótica— fue dependiente de la concentración de estreptidina, de forma que cuando la concentración del “aceptor trampa” se aumentó a 400 µg/mL, la CMI de la estreptomycin frente a la cepa que sobre-expresaba el enzima ANT(6) bajó a 10 µg/mL, restableciéndose casi por completo la actividad antibiótica que posee la estreptomycin frente a la cepa control (CMI= 5 µg/mL).

La recuperación de actividad no fue completa a pesar de administrar una gran cantidad de estreptidina en el medio de cultivo. Además, la relación 40:1 de estreptidina:estreptomycin necesaria para recuperar la actividad antibiótica de la estreptomycin, es inferior a la diferencia que hay entre  $k_{cat}/K_M$  de ambas (más de dos ordenes de magnitud). Esto podría ser debido a que la presencia de estreptidina y/o AMP-estreptidina limitase la tasa de reacción con estreptomycin. Así, podemos suponer que la estreptidina actúa como un “aceptor trampa” de la ANT(6), permitiendo que la estreptomycin se una a su diana ribosomal y recupere la actividad antibiótica en aquellas cepas que han desarrollado resistencia debida a la modificación enzimática del aminoglicósido. Este resultado puede ser el inicio de la síntesis de nuevos compuestos basados en la estructura química de la estreptidina como unidad mínima que sean mejores sustratos de la ANT(6) que ésta e incluso mejores que la estreptomycin. De esta manera podremos disponer de compuestos que actúen como aceptores trampa o como inhibidores a bajas concentraciones.



## **5. CONCLUSIONES**



En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos llevado a cabo la obtención y caracterización bioquímica de un enzima modificador de antibióticos aminoglicósidos, la 6-adeniltransferasa de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*.

El sistema de expresión utilizado nos permitió obtener toda la proteína sobre-expresada en la fracción soluble. Tras llevar a cabo la purificación por IMAC se obtuvo la ANT(6) con una pureza del 85% y una eficacia catalítica de  $2.1 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . El espectro de fluorescencia indica que el microambiente de los triptófanos en la ANT(6) debido al plegamiento de la proteína es significativamente hidrofílico.

Los estudios realizados utilizando dicroísmo circular nos mostraron que se trataba de una proteína con un alto contenido de  $\alpha$ -hélice y un menor contenido de  $\beta$ -lámina en su estructura secundaria. La presencia de iones divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) provoca una transición de estructura de  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -lámina que es más marcada con  $\text{MnCl}_2$ .

En los estudios de desnaturalización térmica en ausencia de magnesio o en presencia de altas concentraciones del ión divalente, se observa una transición entre dos estados. Sin embargo, a bajas concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ , se detecta la presencia de un intermedio en el proceso de desnaturalización que podría estar relacionado con la desnaturalización de un dominio de la proteína. Experimentos en el ultravioleta lejano a distintas temperaturas en presencia de  $\text{MgCl}_2$ , así como de autoagregación y de equilibrio de sedimentación, podrían indicar que la proteína presenta una tendencia alta a formar agregados de alto peso molecular. En los estudios de equilibrio de sedimentación, el tamaño de los agregados disminuye a medida que se aumenta la concentración de  $\text{MgCl}_2$ .

La presencia de la cola de histidinas en la proteína ANT(6) no afecta a su estructura secundaria ni a su eficacia catalítica, mientras que la confiere cierta estabilidad térmica. El estudio por equilibrio de sedimentación mostró que su comportamiento es independiente de la presencia de  $\text{MgCl}_2$ , y que se aproxima al de un dímero por lo que los procesos de agregación parecen estar mediados por la cola de histidinas.

La construcción del modelo tridimensional teórico de la ANT(6) se llevó a cabo por homología remota utilizando como molde la 4'-adeniltransferasa de



*Staphylococcus aureus*. Al comparar el modelo teórico con la estructura de la ANT(6) depositada con posterioridad en el PDB (2PBE), observamos que ambas presentan un dominio de tipo  $\alpha$ -hélice en el extremo C-terminal y un dominio  $\beta$ -lámina en el extremo N-terminal, siendo el porcentaje de estructura secundaria de las dos muy similar al obtenido por dicroísmo circular. Sin embargo, poseían esqueletos carbonados muy diferentes.

La caracterización cinética de la ANT(6) nos mostró que la proteína seguía un mecanismo cinético de tipo secuencial, un pH óptimo de 7.5, y una actividad máxima cuando la concentración de  $Mg^{2+}$  libre era de 17 mM. La actividad enzimática varía según el ión divalente utilizado como cofactor. Así, utilizando un exceso de 2 mM de diferentes iones divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) la mayor actividad nucleotidiltransferasa se obtenía con  $MnCl_2$ .

La ANT(6) tiene una alta especificidad por el antibiótico estreptomicina, a diferencia de lo que ocurre con el nucleótido trifosfato, aunque muestra una mayor preferencia por aquellos que poseen una base púrica frente a pirimidínica.

La estructura de la estreptomicina en disolución se estudió por RMN y dinámica molecular caracterizándose por la presencia de dos poblaciones mayoritarias. Los estudios de reconocimiento molecular de la ANT(6) con el sustrato estreptomicina muestran que la conformación que fija el enzima es sólo una de ellas y que el epítipo de reconocimiento está formado fundamentalmente por la unidad de estreptidina.

La estreptidina es sustrato del enzima ANT(6), con una eficacia catalítica dos ordenes de magnitud inferior a la que posee el enzima por su sustrato natural. Estudios *in vivo* con este compuesto muestran que la estreptidina no posee actividad antibiótica en una cepa control, ni en aquella que sobre-expresa ANT(6).

Al administrar conjuntamente estreptidina y estreptomicina hemos recuperado con éxito la actividad antibiótica *in vivo* del antibiótico. La estreptidina actúa como un “aceptor trampa” de la ANT(6), y la recuperación de la actividad es dependiente de la concentración de estreptidina.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



Aires, J.R., Kohler, T., Nikaido, H., Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**: 2624-2628.

Allen, N.E., Alborn, W.E. Jr., Hobbs J.N. Jr., Kirst, H.A. (1982). 7-Hydroxytropolone: an inhibitor of aminoglycoside-2"-O-adenyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**: 824-831.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schafer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.

Arthur, M., Courvalin, P. (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**: 1563-1571.

Asensio, J.L., Hidalgo, A., Bastida, A., Torrado, M., Corzana, F., Chiara, J.L., García-Junceda, E., Cañada, J., Jiménez-Barbero, J. (2005). A simple structural-based approach to prevent aminoglycoside inactivation by bacterial defense proteins. Conformational restriction provides effective protection against neomycin-B nucleotidylation by ANT4. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**: 8278-8279.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**: 905-920.

Bastida, A., Fernández-Mayoralas, A., Gómez-Arrayás, R., Iradier, F., Carretero, J.C., García-Junceda, E. (2001). Heterologous over-expression of  $\alpha$ -1,6-Fucosyltransferase from *Rhizobium* sp.: application to the synthesis of the trisaccharide  $\beta$ -D-GlcNAc(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-GlcNAc, study of the acceptor specificity and evaluation of polyhydroxylated indolizidines as inhibitors. *Chem. Eur. J.*, **7**: 2390-2397.

Bastida, A., Hidalgo, A., Chiara, J.L., Torrado, M., Corzana, F., Pérez-Cañadillas, J.M., Groves, P., García-Junceda, E., González, C., Jiménez-Barbero, J., Asensio, J.L. (2006). Exploring the use of conformationally locked aminoglycosides as a new strategy to overcome bacterial resistance. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**: 100-116.

Bax, R., Mullan, N., Verhoef, J. (2000). The millennium bugs- the need for and development of new antibacterials. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **16**: 51-59.

Blundell, T.L., Sibanda, B.L., Sternberg, M.J.E., Thornton, J.M. (1987). Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, **326**: 347-352.

Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, **253**: 164-170.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.

Brenner, S. (1987). Phosphotransferase sequence homology. *Nature*, **329**: 21.

Bryan, L.E., Kowand, S.K., van den Elzen, H.M. (1979). Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**: 7-13.

Bryan, L.E., Kwan, S. (1983). Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**: 835-845.

Bryan, L.E., O'Hara, K., Wong, S. (1984). Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**: 250-255.

Bryan, L.E., van den Elzen, H.M. (1977). Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12**: 163-177.

Burk, D.L., Ghuman, N., Wybenga-Groot, L.E., Berghuis, A. (2003). X-ray structure of the AAC(6')-II antibiotic resistance enzyme at 1.8 Å resolution: examination of oligomeric arrangements in GNAT superfamily members. *Protein Sci.*, **12**: 426-437.

Burk, D.L., Hon, W.C., Leung, A.K., Berghuis, A.M. (2001). Structural analysis of nucleotide binding to an aminoglycoside phosphotransferase. *Biochemistry*, **40**: 8756–8764.

Cameron, F.H., Groot-Obbink, D.J., Ackerman, V.P., Hall, R.M. (1986). Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenylyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 8625-8635.

Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Winberg, B.T., Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**: 340-348.

Centron, D., Roy, P.H. (2002). Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbours three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**: 1402-1409.

Chaga, G.S. (2001). Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**: 313-334.

Chang, J.Y. (1985). Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur. J. Biochem.*, **151**: 217-224.

Chen-Goodspeed, M., Vanhooke, J.L., Holden, H.M., Raushel, F.M. (1999). Kinetic mechanism of kanamycin nucleotidyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Chem.*, **27**: 395-408.

Chiosis, G., Boneca, I.G. (2001). Selective cleavage of D-ala-D-lac by small molecules: re-sensitizing resistant bacteria to vancomycin. *Science*, **293**: 1484-1487.

Conly, J.M., Johnston, M.D. (2005). Where are all the new antibiotics?. The new antibiotic paradox. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, **16**: 159-160.

Corzana, F., Cuesta, I., Bastida, A., Hidalgo, A., Latorre, M., González, C., García-Junceda, E., Jiménez-Barbero, J., Asensio, J.L. (2005). Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by bacterial defence proteins: NMR study of the structural and conformational features of streptomycin inactivation by *Bacillus subtilis* aminoglycoside-6-adenyl transferase. *Chem. Eur. J.*, **11**: 5102–5113.

Corzana, F., Cuesta, I., Freire, F., Revuelta, J., Torrado, M., Bastida, A., Jiménez-Barbero, J., Asensio, J.L. (2007). The pattern of distribution of amino groups modulates the structure and dynamics of natural aminoglycosides: implications for RNA recognition. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**: 2849-2865.

Cottarel, G., Wierzbowski, J. (2007). Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *TRENDS in Biotechnology*, **25**: 547-555.

Culebras, E., Martínez, J.L. (1999). Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2''-O-aminoglycoside phosphotransferase. *Front. Biosci.*, **4**: D1-D8.

Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.*, **43**: 207-233.

Cunningham, P.R., Nurse, K., Bakin, A., Weitzmann, C.J., Pflumm, M., Ofengand, J. (1992). Interaction between the two conserved single-stranded regions at the decoding site of small subunit ribosomal RNA is essential for ribosome function. *Biochemistry*, **31**: 12012–12022.

Cunningham, P.R., Nurse, K., Weitzmann, C.J., Ofengand, J. (1993). Functional effects of base changes which further define the decoding center of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. Mutation of C1404, G1405, C1496, G1497, and U1498. *Biochemistry*, **32**: 7172–7180.

Daigle, D.M., Hughes, D.W., Wright, G.D. (1999). Prodigious substrate specificity of AAC(6')-APH(2''), an aminoglycoside antibiotic resistance determinant in enterococci and staphylococci. *Chem. Biol.*, **6**: 99-110.

Daigle, D.M., McKay, G.A., Thompson, P.R., Wright, G.D. (1999). Aminoglycoside antibiotic phosphotransferases are also serine protein kinases. *Chem. Biol.*, **6**: 11-18.

Damper, P.D., Epstein, W. (1981). Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **20**: 803-808.

Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science*, **264**: 375-382.

Davies, J., Davis, B.D. (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.*, **243**: 3312-3316.

Davies, J., Gilbert, W., Gorini, L. (1964). Streptomycin, suppression, and the code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**: 883-890.



Davies, J., Gorini, L., Davis, B.D. (1965). Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.*, **1**: 93-106.

Davies, J., Smith, D.I. (1978). Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu. Rev. Microbiol.*, **32**: 469-518.

Davis, B.D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.*, **51**: 341-350.

D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, **311**: 374-377.

Doherty, E. A., Batey, R. T., Masquida, B., Doudna, J.A. (2000). A universal mode of helix packing in RNA. *Nat. Struct. Biol.*, **8**: 339-343.

Doi, Y., Yokoyama, K., Yamane, K., Wachino, J., Shibata, N., Yagi, T., Shibayama, K., Kato, H., Arakawa, Y. (2004). Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**: 491-496.

Draker, K.A., Northrop, D.B., Wright, G.D. (2003). Kinetic mechanism of the GCN5-related chromosomal aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-II from *Enterococcus faecium*: evidence of dimer subunit cooperativity. *Biochemistry*, **42**: 6265-6274.

Dubois, W., Poirel, L., Marie, C., Arpin, C., Nordmann, P., Quentin, C. (2002). Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*GES-1 and a fused product of *aac(3)-Ib/aac(6')-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**: 638-645.

Ferretti, J.J., Gilmore, K.S., Courvalin, P. (1986). Nucleotide-sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2''-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J. Bacteriol.*, **167**: 631-638.

Fong, D.H., Berghuis, A.M. (2002). Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry. *EMBO J.*, **21**: 2323-2331.

Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C., Puglisi, J.D. (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, **274**: 1367-1371.

Fourmy, D., Recht, M.I., Puglisi, J.D. (1998a). Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16S rRNA. *J. Mol. Biol.*, **277**: 347-362.

Fourmy, D., Yoshizawa, S., Puglisi, J.D. (1998b). Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16S rRNA. *J. Mol. Biol.*, **277**: 333-345.

Fox, J.L. (2006). The business of developing antibacterials. *Nat. biotechnol.*, **24**: 1521-1528.

François, B., Rusell, R.J.M., Murray, J.B., Aboul-Ela, F., Masquida, B., Vicens, Q., Westhof, E. (2005). Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res.*, **33**: 5677-5690.

Frechette, R. (2007). New developments in antibacterial drug R&D. *Annu. Rep. Med. Chem.*, **42**: 349-364.

Fridman, M., Belakhov, V., Yaron, S., Baasov, T. (2003). A new class of branched aminoglycosides: pseudo-pentasaccharide derivatives of neomycin B. *Org. Lett.*, **5**: 3575–3578.

Fritz, T.A., Lugemwa, F.N., Sarkar, A.K., Esko, J.D. (1994). Biosynthesis of heparan sulfate on  $\beta$ -D-xylosides depends on aglycone structure. *J. Biol. Chem.*, **269**: 300-307.

Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., Waring, M.J. (1981). *The Molecular Basis of Antibiotic Action* (Waring, M.J., ed.), Wiley, London.

Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**: 2565-2571.

Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.*, **12**: 543–548.

Gates, C.A., Northrop, D.B. (1988a). Substrate specificities and structure-activity relationships for the nucleotidylation of antibiotics catalyzed by aminoglycoside nucleotidyltransferase 2"-I. *Biochemistry*, **27**: 3820-3825.

Gates, C.A., Northrop, D.B. (1988b). Alternative substrate and inhibition kinetics of aminoglycoside nucleotidyltransferase 2"-I in support of a Theorell-Chance kinetic mechanism. *Biochemistry*, **27**: 3826-3833.

Gates, C.A., Northrop, D.B. (1988c). Determination of the rate-limiting segment of aminoglycoside nucleotidyltransferase 2"-I by pH- and viscosity-dependent kinetics. *Biochemistry*, **27**: 3834-3842.

Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J.M., Mayhew, S. (1974). Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. *Biochemistry*, **13**: 589-597.

Greenwood, D. (1995). Antimicrobial Chemotherapy (Greenwood, D., ed.), pp. 32-48, Oxford University Press, Oxford.

Haddad, J., Kotra, L.P., Llano-Sotelo, B., Kim, C., Azucena, E.F., Liu, M., Vakulenko, S.B., Chow, C.S., Mobashery, S. (2002). Design of novel antibiotics that binds to the ribosomal acyltransfer site. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**: 3229-3237.

Hainrichson, M., Nudelman, I., Baasov, T. (2007). Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. *Org. Biomol. Chem.*, **6**: 227-239.

Hainrichson, M., Pokrovskaya, V., Shallom-Shezifi, D., Fridman, M., Belakhov, V., Shachar, D., Yaron, S., Baasov, T. (2005). Branched aminoglycosides: biochemical studies and antibacterial activity of neomycin B derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**: 5797–5807.

Hancock, R.E. (1984). Alterations in outer membrane permeability. *Annu. Rev. Microbiol.*, **38**: 237-264.

Hancock, R.E., Farmer, S.W., Li, Z.S., Poole, K. (1991). Interactions of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**: 1309-1314.

Hansen, L.H., Mauvais, P., Douthwaite, S. (1999). The macrolide–ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol. Microbiol.*, **31**: 623-631.

Hartmann, R., Justesen, J., Sarkar, S.N., Sen, G.C., Yee, V.C. (2003). Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *Mol. Cell*, **12**: 1173-1185.

Hatch, R.A., Schiller, N.L. (1998). Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**: 974-977.

Hayashi, S.F., Norcia, L.J., Seibel, S.B., Silvia, A.M. (1997). Structure-activity relationships of hygromycin A and its analogs: protein synthesis inhibition activity in a cell free system. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **50**: 514-521.

Hedge, S.S., Javid, Majd, F., Blanchard, J.S. (2001). Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally encoded aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase (AAC(2')-Ic) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, **276**: 45876-45881.

Hollingshead, S., Vapnek, D. (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid*, **13**: 17-30.

Hotta, K., Zhu, C.B., Ogata, T., Sunada, A., Ishikawa, J., Mizuno, S., Kondo, S. (1996). Enzymatic 2'-N-acetylation of arbekacin and antibiotic activity of its product. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **49**: 458-464.

IDSA society. (2004). Bad Bugs, No Drugs. As antibiotic discovery stagnates: a public health crisis brews. ([www.idsociety.org](http://www.idsociety.org))

Jacoby, G.A., Blaser, M.J., Santanam, P., Hachier, H., Kayser, F.H., Hare, R.S., Miller, G.H. (1990). Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**: 2381-2386.

Jana, S., Chaudhuri, T.K., Deb, J.K. (2006). Effects of guanidine hydrochloride on the conformation and enzyme activity of streptomycin adenylyltransferase monitored by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry (Moscow)*, **71**: 1230-1237.

Jana, S., Deb, J.K. (2005). Kinetic mechanism of streptomycin adenylyltransferase from a recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, **27**: 519-524.

Jana, S., Deb, J.K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**: 140-150.

Jana, S., Karan, G., Deb, J.K. (2005). Purification of streptomycin adenylyltransferase from a recombinant *Escherichia coli*. *Protein Express. Purif.*, **40**: 86-90.

Kagawuchi, H., Naito, T., Nakagawa, S., Fujisawa, K.I. (1972). BB-K8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiot.*, **25**: 695-708.

Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1751**: 119-139.

Kim, C., Heseck, D., Zajíček, Vakulenko, S.B., Mobashery, S. (2006). Characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme ANT(3'')-II/AAC(6')-IId from *Serratia marcescens*. *Biochemistry*, **45**: 8368-8377.

Kim, C., Villegas-Estrada, A., Heseck, D., Mobashery, S. (2007). Mechanistic characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **46**: 5270-5282.

Knowles, J.R. (1985). Penicillin resistance: the chemistry of beta-lactamase inhibition. *Acc. Chem. Res.*, **18**: 97-105.

Kondo, S., Hotta, K. (1999). Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: development and enzymatic modifications. *J. Infect. Chemother.*, **5**: 1-9.

Kondo, S., Iinuma, K., Yamamoto, H., Maeda, K., Umezawa, H. (1973). Synthesis of 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]-kanamycin B and -3',4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin resistant bacteria. *J. Antibiot.*, **26**: 412-415.

Kono, M., Ohmiya, K., Kanda, T., Noguchi, N., O'hara, K. (1987). Purification and characterization of chromosomal streptomycin adenylyltransferase from derivatives of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *FEMS Microbiology Letters*, **40**: 223-228.

Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**: 3249-3256.

Lakowicz, J.R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy (Lakowicz, J.R., ed.), pp 445-486, Plenum Press, New York.

Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993). PROCHECK- A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, **26**: 283-291.

Latorre, M., Peñalver, P., Revuelta, J., Asensio, J.L., García –Junceda, E., Bastida, A. (2007). Rescue of the streptomycin antibiotic activity by using streptidine as a “decoy acceptor” for the aminoglycoside-inactivating enzyme adenylyltransferase. *Chem. Commun.*, **27**: 2829-2831.

Le Goffic, F., Martel, A., Capmau, M.L., Baca, B., Goebel, P., Chardon, H., Soussy, C.J., Duval, J., Bouanchaud, D. H. (1976). New plasmid-mediated nucleotidylation of aminoglycoside antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **10**: 258-264.

Leigh, D.A., Bradnock, K., Marriner, J.M. (1981). Augmentin (amoxicillin and clavulanic acid) therapy in complicated infections due to  $\beta$ -lactamase-producing bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **7**: 229–236.

Li, J., Chen, H.N., Chang, H., Wang, J., Chang, C.W. (2005). Tuning the regioselectivity of the Staudinger reaction for the facile synthesis of kanamycin and neomycin class antibiotics with N-1 modification. *Org. Lett.*, **7**: 3061-3064.

Li, J., Chiang, F.I., Chen, H.N., Chang, C.W. (2007). Investigation of the regioselectivity for the Staudinger reaction and its application for the synthesis of aminoglycosides with N-1 modification. *J. Org. Chem.*, **72**: 4055-4066.

Llano-Sotelo, B., Azucena, E.F., Kotra, L.P., Mobashery, S., Chow, C.S. (2002). Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem. Biol.*, **9**: 455-463.

Lombardini, J.B., Cheng-Chu, M. (1980). Properties of gentamicin adenyltransferase obtained from R-factor-resistant *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem.*, **12**: 427-431.

Lovering, A.M., White, L.O., Reeves, D.S. (1987). AAC-(1): a new aminoglycoside-acetylating enzyme modifying the C1 aminogroup of apramycin. *J. Antimicrob. Chemother.*, **20**: 803-813.

Lüthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, **356**: 83-85.

Maeda, K., Fujii, F., Kondo, S., Umezawa, H. (1967). Chemical derivation of antibiotics active against resistant bacteria. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **21**: 224-227.

Magnet, S., Blanchard, J.S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.*, **105**: 477-497.

Magnet, S., Lambert, T., Courvalin, P., Blanchard, J.S. (2001). Kinetic and mutagenic characterization of the chromosomally encoded *Salmonella enterica* AAC(6')-ly aminoglycoside N-acetyltransferase. *Biochemistry*, **40**: 3700-3709.



Martin, N.L., Beveridge, T.J. (1986). Gentamicin interaction with *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **29**: 1079-1087.

Martin, G., Keller, W., Doublé, S. (2000). Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *EMBO J.*, **19**: 4193-4203.

Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Nishino, T. (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**: 3322-3327.

Mayr, L.M., Landt, O., Hahn, U., Schmid, F.X. (1993). Stability and folding kinetics of ribonuclease T<sub>1</sub> are strongly altered by the replacement of *Cis*-proline 39 with alanine. *J. Mol. Biol.*, **231**: 897-912.

McKay, G.A., Thompson, P.R., Wright, G.D. (1994). Broad spectrum aminoglycoside phosphotransferase type III from *Enterococcus*: overexpression, purification, and substrate specificity. *Biochemistry*, **33**: 6936-6944.

McKay, G.A., Wright, G.D. (1995). Kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase type IIIa. Evidence for a Theorell-Chance mechanism. *J. Biol. Chem.*, **270**: 24686-24692.

Meier, A., Kirschner, P., Bange, F.C., Vogel, U., Bottger, E.C. (1994). Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**: 228-233.

Mendes, R.E., Toleman, M.A., Ribeiro, J., Sader, H.S., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2004). Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-16</sub>, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')*-30/*aac(6')*-Ib': report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**: 4693-4702.

Meyer, B., Peters, T. (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**: 864-890.

Miller, M.H., Edberg, S.C., Mandel, L.J., Behar, C.F., Steigbigel, N.H. (1980). Gentamicin uptake in wild-type and aminoglycoside-resistant small-colony mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**: 722-729.

Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**: 727-737.

Minowa, N., Akiyama, Y., Hiraiwa, Y., Maebashi, K., Usui, T., Ikeda, D. (2006). Synthesis and antibacterial activity of novel neamine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**: 6351-6354.

Mitscher, L.A. (2002). Antibiotics and antimicrobial agents. En Foye's Principles of Medicinal Chemistry (Williams, D.A, Lemke, T.L., ed), pp. 788-791, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (Philadelphia).

Moazed, D., Noller, H.F. (1986). Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. *Cell*, **47**: 985-994.

Moazed, D., Noller, H.F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, **327**: 389-394.

Moazed, D., Noller, H.F. (1990). Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in 16S rRNA. *J. Mol. Biol.*, **211**: 135-145.

Murphy, E. (1985). Nucleotide sequence of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3')(9). *Mol. Gen. Genet.*, **200**: 33-39.

Nelson, M.L., Levy, S.B. (1999). Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**: 1719-1724.

Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 4899–4903.

Neu, H.C., Wilson, A.P., Grüneberg, R.N. (1993). Amoxycillin/clavulanic acid: a review of its efficacy in over 38,500 patients from 1979 to 1992. *J. Chemother.*, **5**: 67-93.

Noller, H.F. (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**: 191-227.

Norrby, S.R., Nord, C.E., Finch, R. (2005). Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect. Dis.*, **5**: 115-119.

Núñez, E., Wei, X., Delgado, C., Rodríguez-Crespo, I., Yélamos, B., Gómez-Gutiérrez, J., Peterson, D.L., Gavilanes, F. (2001). Cloning, expression, and purification of histidine-tagged preS domains of hepatitis B virus. *Protein Expr. Purif.*, **21**: 183-191.

Nurizzo, D., Shewry, S.C., Perlin, M.H., Brown, S.A., Dholakia, J.N., Fuchs, R.L., Deva, T., Baker, E.N., Smith, C.A. (2003). The crystal structure of aminoglycoside-3'-phospho-transferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance. *J. Mol. Biol.*, **327**: 491–506.

Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Tarry, M.J., Carter, A.P., Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, **292**: 897–902.

O'hara, K., Ohmiya, K., Kono, M. (1988). Structure of adenylated streptomycin synthesized enzymatically by *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**: 949-950.

Ohmiya, K., Tanaka, T., Noguchi, N., O'Hara, K., Kono, M. (1989). Nucleotide sequence of the chromosomal gene coding for the aminoglycoside 6-adenylyltransferase from *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Gene*, **78**: 377-378.

Okayama, M., Kimata, K., Suzuki, K. (1973). The influence of  $\alpha$ -nitrophenyl  $\beta$ -D-xyloside on the synthesis of proteochondroitin sulfate by slices of embryonic chick cartilage. *Biochem. J.*, **74**: 1069-1073.

Ounissi, H., Derlot, E., Carlier, C., Courvalin, P. (1990). Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in grampositive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**: 2164-2168.

Pape, T., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V. (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat. Struct. Biol.*, **7**: 104–107.

Payie, K.G., Rather, P.N., Clarke, A.J. (1995). Contribution of gentamicin 2'-N-Acetyltransferase to the O acetylation of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. *J. Bacteriol.*, **177**: 4303-4310.

Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., Pompliano, D.L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**: 29-40.

Peck, R.L., Graber, R.P., Walti, A., Peel, E.W., Hoffhine, C.H., Folkers, K. (1946). Streptomyces antibiotics. IV. Hydrolytic cleavage of streptomycin to streptidine. *J. Am. Chem. Soc.*, **68**: 29-31.

Pedersen, L.C., Benning, M.M., Holden, H.M. (1995). Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. *Biochemistry*, **34**: 13305-13311.

Pelton, J.T., McLean, L.R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein second structure. *Anal. Biochem.*, **277**: 167-176.

Phillips, I., Shannon, K. (1984). Aminoglycoside resistance. *Br. Med. Bull.*, **40**: 28-35.

PhRMA Survey. (2004). Medicines in development for infectious diseases. ([www.phrma.org](http://www.phrma.org)).

Purohit, P., Stern, S. (1994). Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature*, **370**: 659-662.

Putman, M., van Veen, H.W., Konings, W.N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 672-693.

Rather, P.N., Orosz, E., Shaw, K.J., Hare, R., Miller, G. (1993). Characterization and transcriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from *Providencia stuartii*. *J. Bacteriol.*, **175**: 6492-6498.

Renau, T.E., Léger, R., Yen, R., She, M.W., Flamme, E.M., Sangalang, J., Gannon, C.L., Chamberland, S., Lomovzkaya, O., Lee, V.J. (2002). Peptidomimetics of efflux pump inhibitors potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**: 763-766.

Rodnina, M.V., Daviter, T., Gromadski, K., Wintermeyer, W. (2002). Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie*, **84**: 745-754.

Rodnina, M.V., Wintermeyer, W. (2001). Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends. Biochem. Sci.*, **26**: 124-130.

Roestamadj, J., Grapsas, I., Mobashery, S. (1995). Mechanism-based inactivation of bacterial aminoglycoside 3'-phosphotransferases. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 80-84.

Rouch, D.A., Byrne, M.E., Kong, Y.C., Skurray, R.A. (1987). The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 3039-3052.

Rudolph, F.B. (1979). Product inhibition and abortive complex formation. *Methods Enzymol.*, **63**: 411-436.

Sakon, J., Liao, H.H., Kanikula, A.M., Benning, M.M., Rayment, I., Holden, H.M. (1993). Molecular structure of kanamycin nucleotidyltransferase determined to 3.0 Å resolution. *Biochemistry*, **32**: 11977-11984.

Sali, A., Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**: 779-815.

Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (Nolan, C., ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez Navarro, A. (2005). New formulations of amoxicillin/clavulanic acid: a pharmacokinetic and pharmacodynamic review. *Clin. Pharmacokinet.*, **44**: 1097-1115.

Sander, C., Schneider, R. (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Protein Struct. Funct. Genet.*, **9**: 56-68.

Schatz, A., Waksman, S.A. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **57**: 244-248.

Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell*, **102**: 615-623.

Schmidt, F.R., Nucken, E.J., Henschke, R.B. (1988). Nucleotide sequence analysis of 2''-aminoglycoside nucleotidyl-transferase ANT(2'') from Tn4000: its relationship with AAD(3') and impact on Tn21 evolution. *Mol. Microbiol.*, **2**: 709-717.

Serrano, A.G., Cabré, E.J., Oviedo, J.M., Cruz, A., González, B., Palacios, A., Estrada, P., Pérez-Gil, J. (2006). Production in *Escherichia coli* of a recombinant C-terminal truncated precursor of surfactant protein B (rproSP-B<sub>ΔC</sub>). Structure and interaction with lipid interfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**: 1621-1632.

Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.*, **57**: 138-163.

Shen L.L., Baranowski J., Pernet A.G. (1989). Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: specificity and cooperativity of drug binding to DNA. *Biochemistry*, **28**: 3879–3885.

Shi, J., Blundell, T.L., Mizuguchi, K. (2001). FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J. Mol. Biol.*, **310**: 243–257.

Silva, J.G., Carvalho, I. (2007). New insights into aminoglycoside antibiotics and derivatives. *Curr. Med. Chem.*, **14**: 1101-1119.

- Skeggs, P.A., Thompson, J., Cundliffe, E. (1985). Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*. *Mol. Gen. Genet.*, **200**: 415-421.
- Smith, C.A., Baker, E.N. (2002). Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr. Drug Targets: Infect. Disord.*, **2**: 143-160.
- Smith, A.L., Smith, D.H. (1974). Gentamicin: adenine mononucleotide transferase: partial purification, characterization, and use in the clinical quantitation of gentamicin. *J. Infect. Dis.*, **129**: 391-401.
- Spellberg, B., Powers, J.H., Brass, E.P., Miller, L.G., Edwards, J.E. (2004). Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.*, **38**: 1279-1286.
- Spratt, B.G., Cromie, K.D. (1988). Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.*, **10**: 699-711.
- Sreerama, N., Woody, R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.*, **287**: 252-260.
- Stahl, G., McCarty, G.P., Farabaugh, P.J. (2002). Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends. Biochem. Sci.*, **27**: 178–183.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**: 680–685.



Sucheck, S.J., Wong, A.L., Koeller, K.M., Boehr, D.D., Draker, K., Sears, P., Wright, G.D. (2000). Design of bifunctional antibiotics that target bacterial rRNA and inhibit resistance-causing enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**: 5230-5231.

Sunada, A., Nakajima, M., Ikeda, Y., Kondo, S., Hotta, K. (1999). Enzymatic 1-*N*-acetylation of paromomycin by an actinomycete strain # 8 with multiple aminoglycoside resistance and paromomycin sensitivity. *J. Antibiot. (Tokio)*, **52**: 809-814.

Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., Arrow, S.A. (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.*, **51**: 439-457.

Tan, Y.T., Tillett, D.J., McKay, I.A. (2000). Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol. Med. Today*, **6**: 309-314.

Taylor, P.W., Stapleton, P.D., Luzio, J.P. (2002). New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov. Today*, **7**: 1086-1091.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.

Thompson, P.R., Hughes, D.W., Wright, G.D. (1996). Regiospecificity of aminoglycoside phosphotransferase from *Enterococci* and *Staphylococci* (APH(3')-IIIa). *Biochemistry*, **35**: 8686-8695.

Thompson, J., Skeggs, P.A., Cundliffe, E. (1985). Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to the aminoglycoside antibiotics gentamicin and kanamycin determined by DNA from the gentamicin-producer, *Micromonospora purpurea*. *Mol. Gen. Genet.*, **201**: 168-173.

Trieu-Cuot, P., Courvalin, P. (1983). Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3' 5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene*, **23**: 331-341.

Ubutaka, K., Yamashita, N., Gotoh, A., Konno, M. (1984). Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**: 754-759.

Umezawa, H., Hayano, S., Ogata, Y. (1948). Classification of antibiotic strains of streptomyces and their antibiotic substance on the basis of their antibacterial spectra. *Jpn. Med. J.*, **1**: 504-511.

Umezawa, H., Okanishi, M., Kondo, S., Hamana, K., Utahara, R., Maeda, K., Mitsuilashi, S. (1967). Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. *Science*, **157**: 1559-1561.

Umezawa, H., Takazi, T., Okami, Y., Fukuyama, S. (1949). Studies on streptothricin group substances. On streptothricin A and streptothricin B. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **3**: 232-235.

Umezawa, H., Tsuchiya, T., Muto, R., Nishimura, Y., Umezawa, H. (1971a). Synthesis of 3'-deoxykanamycin effective against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.*, **24**: 274-275.

Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K., Takeuchi, T. (1957). Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **A10**: 181-188.

Umezawa, H., Umezawa, S., Tsuchiya, T., Okazaki, I. (1971b). 3',4'-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.*, **24**: 485-487.

Vakulenko, S.B., Donabedian, S.M., Voskresenskiy, A.M., Zervos, M.J., Lerner, S.A., Chow, J.W. (2003). Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**: 1423-1426.

Vakulenko, S.B., Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**: 430-450.

Van Mierlo, C.P.M., Steensma, E. (2000). Protein holding and stability investigated by fluorescent, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story. *J. Biothechnol.*, **79**: 281-298.

Van Pelt, J.E., Northrop, D.B. (1984). Purification and properties of gentamicin nucleotidyltransferase from *Escherichia coli*: nucleotide specificity, pH optimum, and the separation of two electrophoretic variants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **230**: 250-263.

Vetting, M.W., Hedge, S.S., Javid-Majd, F., Blanchard, J.S., Roderick, S.L. (2002). Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with coenzyme A and aminoglycoside substrates. *Nat. Struct. Biol.*, **9**: 653-658.

Vetting, M.H., Magnet, S., Nieves, E., Roderick, S.L., Blanchard, J.S. (2004). A bacterial acetyltransferase capable of regioselective *N*-acetylation of antibiotics and histones. *Chem. Biol.*, **11**: 565-573.

Vicens, Q., Westhof, E. (2001). Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*, **9**: 647-658.

Vicens, Q., Westhof, E. (2002). Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site. *Chem. Biol.*, **9**: 747-755.

Vicens, Q., Westhof, E. (2003a). Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J. Mol. Biol.*, **326**: 1175-1188.

Vicens, Q., Westhof, E. (2003b). Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of X-ray crystal structures. *Biopolymers*, **70**: 42-57.

Waksman, S.A., Lechavelier, H.A. (1949). Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science*, **109**: 305-307.

Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial resistance. *Nature*, **406**: 775-781.

Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from?. *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**: 65-70.

Weinstein, M.J., Wagman, G.H., Oden, E.M., Marquez, J.A. (1967). Biological activity of the antibiotic components of the gentamicin complex. *J. Bacteriol.*, **94**: 789-790.

Williams, D.H. (1996). The glycopeptide story: how to kill the deadly "superbugs". *Nat. Prod. Rep.*, **13**: 469-477.

Williams, J.W., Northrop, D.B. (1976). Purification and properties of gentamicin acetyltransferase I. *Biochemistry*, **15**: 125-131.

Williams, J.W., Northrop, D.B. (1979). Synthesis of a tight-binding, multisubstrate analog inhibitor of gentamicin acetyltransferase I. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **32**: 1147-1154.

Winberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonnrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**: 327-39.

Wolf, E., Vassilev, A., Makino, Y., Sali, A., Nakatani, Y., Burley, S.K. (1998). Crystal structure of a GCN5-related *N*-acetyltransferase: *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-*N*-acetyltransferase. *Cell*, **94**: 439-449.

Wong, C.-H., García-Junceda, E., Chen, L., Blanco, O., Gijssen, H.J.M., Steensma, D.H. (1995). Recombinant 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase in organic synthesis: use of sequential two-substrate and three-substrate aldol reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 3333-3339.

Wong, C.-H., Ritter, T.K. (2001). Carbohydrate-based antibiotics: a new approach to tackling the problem of resistance. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**: 3508-3533.

Woodcock, J., Moazed, D., Cannon, M., Davies, J., Noller, H.F. (1991). Interaction of antibiotics with A and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.*, **10**: 3099-3103.

Wright, G.D. (1999). Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**: 499-503.

Wright, G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**: 1451-1470.

Wright, G.D., Ladak, P. (1997). Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**: 956-960.

- Wright, E, Serpersu, E.H. (2005). Enzyme-substrate interactions with an antibiotic resistance enzyme: aminoglycoside nucleotidyltransferase (2'')-Ia characterized by kinetic and thermodynamic methods. *Biochemistry*, **44**: 11581-11591.
- Wright, G.D., Thompson, P.R. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front. Biosci.*, **4**: 9-21.
- Wybenga-Groot, L.E., Draker, K., Wright, G.D., Berghuis, A.M. (1999). Crystal structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. *Struct. Fold Des.*, **7**: 497-507.
- Yamane, K., Wachino, J., Doi, Y., Kurokawa, H., Arakawa, Y. (2005). Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**: 951-953.
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H., Arakawa, Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, **362**: 1888-1893.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., Eason, R.G., Puglisi, J.D. (2002). Sequence-specific recognition of the major groove of RNA by Deoxystreptamine. *Biochemistry*, **41**: 6263-6270.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., Puglisi, J.D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.*, **17**: 6437-6448.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., Puglisi, J.D. (1999). Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science*, **285**: 1722-1725.
- Zarrilli, R., Tripodi, M., Di Popolo, A., Fortunato, R., Bagattini, M., Crispino, M., Florio, A., Triassi, M., Utili, R. (2005). Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**: 827-835.







